



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MATHEUS SILVA LAGE

**EFEITOS DOS INIBIDORES DO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO
VERDE NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR
Saccharomyces cerevisiae GENETICAMENTE MODIFICADA**

VITÓRIA, ES

2020

MATHEUS SILVA LAGE

**EFEITOS DOS INIBIDORES DO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO
VERDE NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR
Saccharomyces cerevisiae GENETICAMENTE MODIFICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos

VITÓRIA, ES

2020

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFES, após a conclusão das
correções sugeridas pela banca examinadora**

MATHEUS SILVA LAGE

**EFEITOS DOS INIBIDORES DO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO
VERDE NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR
Saccharomyces cerevisiae GENETICAMENTE MODIFICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 03 de fevereiro de 2020.

Prof^a.Dr^a. Patricia Machado Bueno
Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador

Prof^a. Dr^a. Iara Reboucas Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Universidade de Brasília
Membro Externo

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Suplente

VITÓRIA, ES

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPES e FINEP que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Patrícia M. B. Fernandes pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), pelas orientações, pela paciência e todos os ensinamentos durante esses dois anos. Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alexandre M. C. Santos, agradeço pela dedicação e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

Aos professores Prof. Dr. Antonio A. R. Fernandes e Prof. Dr. Jose A. Ventura agradeço por todo o conhecimento compartilhado.

Deixo meu agradecimento especial a toda equipe do LBAA que me acolheu, me ensinou e tornou os meus dias melhores. Aos doutores Tathiana, Oeber e Flávia pela amizade, dicas, conselhos e ensinamentos para seguir essa carreira. Aos meus amigos Luiza Favarato, Rachel, Luiza Adami, Ane, Mari, Miri, Marcos e Marlonni que agora fazem parte da minha vida e deste trabalho.

Agradeço aos membros da minha banca, Prof. Dr. Fernando Araripe e Profa. Dra. Iara Pinheiro pela disponibilidade e empenho ao ler minha dissertação, sei como o tempo é corrido e fico lisonjeado com a contribuição de ambos ao meu trabalho.

Gratidão à minha família, o meu porto seguro. Aos meus pais, Omar e Iris, por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem, me respeitarem, me ajudarem e me incentivarem. Me chamaram tanto de inteligente que acreditei! Agradeço ao meu irmão Felipe pelo companheirismo e por nunca descontado os tapas que ganhou quando criança. Agradeço ao meu namorado Walber, pelo amor e paciência para passar mais essa etapa ao meu lado e por me ajudar em todos os momentos. Agradeço também à família que escolhi: meus grandes amigos de infância, da rua, da escola e da faculdade que estão comigo até hoje!

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

LAGE, M. S. Efeitos dos inibidores do hidrolisado da casca de coco verde na produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. 2020. 58f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos é uma das principais fontes renováveis para suprir a crescente demanda energética e contribuir com a produção dos combustíveis convencionais. A casca de coco verde é um resíduo descartado a toneladas, se tornando um problema ambiental. Por isso, sua utilização para a produção do etanol de segunda geração é uma solução sustentável para a indústria. Para a obtenção do etanol, a biomassa lignocelulósica passa por tratamentos físicos e químicos para disponibilizar açúcares fermentáveis. No entanto, os açúcares vêm acompanhados de compostos que inibem o crescimento e a fermentação de microrganismos, incluindo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o principal organismo utilizado na produção industrial de etanol. Considerando o impacto que os compostos inibitórios exercem no rendimento de etanol de segunda geração, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos dos principais inibidores da casca de coco verde, individualmente e em associação, no crescimento e na fermentação por uma cepa de *S. cerevisiae* geneticamente modificada. Os resultados dos experimentos mostraram que os ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico) em meio sintético afetam negativamente a taxa de crescimento da cepa G2-104, mas não prejudicam os títulos de etanol quando avaliados em condições viáveis para o desenvolvimento da cepa. O ácido 4-hidróxibenzoico é o principal composto fenólico presente na biomassa de coco verde e não exerceu efeitos negativos no crescimento e na fermentação pela cepa dentro das concentrações avaliadas. Além disso, quando adicionado juntamente a uma alta concentração de ácido fórmico, o desempenho da cepa melhorou quando comparado ao perfil fermentativo da levedura na presença de ácido fórmico individualmente. Nos hidrolisados de coco, a cepa obteve os rendimentos de etanol próximos ao resultado obtidos em meio sintético, mesmo com a adição de mais compostos inibitórios ao meio, demonstrando que a linhagem possui tolerância e bom desempenho neste tipo de hidrolisado.

Palavras-chave: Inibidores lignocelulósicos. Bioetanol. Etanol 2G.

ABSTRACT

LAGE, M. S. Green coconut husk hydrolysate inhibitors effect on second generation ethanol production by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*

Ethanol production from lignocellulosic waste is one of the main renewable sources to supply the growing energy demand and contribute to the production of conventional fuels. Green coconut shell is a waste discarded by the ton, becoming an environmental problem. Therefore, its use for the production of second generation ethanol is a sustainable solution for the industry. To obtain ethanol, lignocellulosic biomass undergoes physical and chemical treatments to make fermentable sugars available. However, sugars come with compounds that inhibit the growth and fermentation of microorganisms, including the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the main organism used in the industrial production of ethanol. Considering the impact that the inhibitory compounds have on the second generation ethanol yield, the objective of the present work was to evaluate the effects of the main inhibitors of the green coconut husk, individually and in association, on the growth and fermentation by a genetically modified *S. cerevisiae* strain. The test results showed that weak acids (acetic acid and formic acid) in synthetic medium negatively affect the growth rate of the G2-104 strain, but do not harm ethanol titers when evaluated under viable conditions for the development of the strain. The 4-hydroxybenzoic acid is the main phenolic compound present in green coconut biomass and did not have negative effects on growth and fermentation by the strain within the concentrations evaluated. In addition, when added together with a high concentration of formic acid, the performance of the strain improved when compared to the fermentative profile of yeast in the presence of formic acid individually. In coconut hydrolysates, the strain obtained ethanol yields close to the result obtained in synthetic medium, even with the addition of more inhibitory compounds to the medium, demonstrating that the strain has tolerance and good performance in this type of hydrolysate.

Key words: Lignocellulosic inhibitors. Bioethanol. Ethanol 2G.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arquitetura da parede celular contendo celulose, hemicelulose e lignina.	15
Figura 2 - Fermentação em leveduras.....	18
Figura 3 - Média da composição de biomassas lignocelulósicas, e os açúcares e compostos inibitórios resultantes do pré-tratamento e hidrólise.....	20
Figura 4 - Fluxograma do delineamento experimental.	25
Figura 5 - Teste de fermentação em meio sintético realizado em frascos de 50 mL.	28
Figura 6 - Teste de fermentação do hidrolisado realizado em frascos de 50 mL.	31
Figura 7 - Curva de crescimento da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes inibidores.....	33
Figura 8 - Curva de crescimento da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações dos inibidores em associação.	36
Figura 9 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de inibidores.....	38
Figura 10 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido fórmico.....	39
Figura 11 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido 4-hidroxibenzóico	40
Figura 12 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético e ácido fórmico em associação	41
Figura 13 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético e ácido 4-hidroxibenzóico em associação.....	43
Figura 14 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzóico em associação.	44
Figura 15 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético suplementado com xilose	45
Figura 16 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 no hidrolisado alcalino do mesocarpo do coco verde com adição de inibidores..	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais países produtores de etanol	14
Tabela 2 - Rendimento e produtividade volumétrica do etanol na fermentação da cepa G2-104 em meio sintético com e sem a adição de inibidores	47
Tabela 3 - Rendimento e produtividade volumétrica do etanol na fermentação da cepa G2-104 no hidrolisado do mesocarpo da casca de coco verde com e sem a adição de inibidores	50

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AAC – ácido acético

AFO – ácido fórmico

ATP – adenosina trifosfato

A4H – ácido 4-hidroxibenzóico

CO₂ – dióxido de carbono

DO – densidade óptica

et al. – e outros (do latim *et alia*)

EtOH – etanol

g – gramas

h – horas

ha – hectare

HMC – hidrolisado do mesocarpo da casca de coco verde

HMF - 5-hidroximetil-2-furaldeído

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High-performance Liquid Chromatograph*)

L - litros

mL – mililitros

m/v – massa por volume

nm – nanômetros

pH – potencial Hidrogeniônico

p/s – produto por substrato

Qp – produtividade volumétrica do etanol

rpm - rotações por minuto

°C – grau Celsius

YNB – Base Nitrogenada para Leveduras (do inglês *Yeast Nitrogen Base*)

YPDX – Extrato de Levedura Peptona Dextrose Xilose (do inglês *Yeast extract Peptone Dextrose Xylose*)

Yp/s – rendimento do etanol

5C – açúcares de 5 carbonos

6C – açúcares de 6 carbonos

g – força g

1G – primeira geração

2G – segunda geração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A BUSCA PELO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL.....	13
1.3 A FERMENTAÇÃO POR LEVEDURAS	17
1.4 OS INIBIDORES E SEUS EFEITOS EM <i>S. cerevisiae</i>	19
1.5 A CASCA DE COCO VERDE.....	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 LEVEDURA	26
4.2 INÓCULOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	26
4.3 INIBIDORES.....	27
4.4 TESTE DE CRESCIMENTO	27
4.5 TESTE DE FERMENTAÇÃO	28
4.6 HIDROLISADO DA CASCA DE COCO VERDE	29
4.6.1 Obtenção e produção do pó do mesocarpo	29
4.6.2 Pré-tratamento alcalino	29
4.6.3 Hidrólise enzimática	30
4.7 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO VERDE.....	30
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇUCARES E ETANOL.....	31
4.9 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTOS	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 EFEITO DOS INIBIDORES NO CRESCIMENTO DE <i>S. cerevisiae</i>	32
5.2 EFEITO DOS INIBIDORES NO PERFIL FERMENTATIVO DE <i>S. cerevisiae</i>	37
5.3 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DOS INIBIDORES NO RENDIMENTO DE ETANOL.....	46
5.4 PERFIL FERMENTATIVO DE <i>S. cerevisiae</i> NO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO VERDE	48
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 A BUSCA PELO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Os principais problemas enfrentados no mundo moderno estão relacionados ao aquecimento global, à dependência dos combustíveis fósseis e à segurança alimentar e energética. O crescente desenvolvimento industrial acompanhado do crescimento populacional está elevando o aumento da demanda por energia, ao passo que, o uso dos combustíveis convencionais para o suprimento energético emite ainda mais gases de efeito estufa (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2017; ROBAK; BALCEREK, 2018).

A energia é essencial para manter o estilo de vida da humanidade e permitir o seu desenvolvimento. Na demanda energética mundial, o setor de transportes se destaca na segunda posição no consumo de energia, consumindo 30% de toda energia produzida. Estima-se que esse valor continue crescendo anualmente e aumente 1,8% entre os anos de 2005 e 2035. No entanto, a maior parte da energia consumida pelos transportes (96,6%) ainda é proveniente de combustíveis fósseis (KUMAR, R. P. et al., 2020).

O provável esgotamento das reservas dos combustíveis fósseis e o impacto ambiental resultantes de sua queima estão mobilizando muitos cientistas a desenvolverem pesquisas para encontrar combustíveis alternativos (ATABANI et al., 2012). Neste contexto, os biocombustíveis emergem como uma das fontes mais importantes de energias renováveis no desenvolvimento sustentável. Através deles, pode-se limitar as emissões de gases de efeito estufa, reduzir a degradação do ambiente e possibilitar a exploração de novos recursos energéticos (RAUD et al., 2019). Além disso, utilização de biocombustíveis é importante por aumentar a empregabilidade e estimular economicamente as produções de áreas rurais (SIMS et al., 2010; VELUSAMY; GUNASEKARIAN, 2005).

O bioetanol, butanol e biodiesel são os biocombustíveis de maior interesse científico, governamental e industrial (HILL et al., 2006). Dentre eles, o bioetanol representa uma alternativa promissora à gasolina no setor de transporte (ROBAK; BALCEREK, 2018).

Em 2016, o uso do etanol na gasolina diminuiu as emissões de gases do efeito estufa num valor equivalente a 43,5 milhões de toneladas de CO₂ vindos do transporte, o mesmo que se obteria com a remoção por um ano de 9,3 milhões de automóveis das ruas (RFA, 2017).

No ano de 2017, a produção global do etanol chegou a 105,5 bilhões de litros, ultrapassando os 101 bilhões de litros produzidos em 2016 (GAGLIANO E XIONG 2017). Os Estados Unidos e o Brasil dominam esse setor produzindo 84% do etanol mundial (DAS, et al. 2020). Os maiores produtores desse combustível estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais países produtores de etanol. Fonte: KUMAR, R. P. et al. (2020) adaptado

Países	Produção em bilhões de litros
Estados Unidos	68
Brasil	28,5
China	3,3
Canadá	1,7
Tailândia	1,5

1.2 O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O etanol é o biocombustível mais utilizado nos meios de transporte. As diferenças entre o etanol de primeira geração (etanol 1G) e o etanol de segunda geração (etanol 2G) estão relacionadas à forma que eles são obtidos. O etanol 1G é produzido de forma mais simples, a partir de matérias-primas ricas em açúcares simples ou amido, enquanto o etanol 2G precisa passar por etapas mais complexas na sua produção, tendo como substrato biomassas lignocelulósicas (SAHA et al., 2017). As biomassas lignocelulósicas possuem características promissoras para a produção deste combustível, pois estão presentes em grandes quantidades no ambiente e,

principalmente, por não competirem com a produção alimentícia, sendo subprodutos das agroindústrias (TABATABAEI et al., 2015).

Os materiais lignocelulósicos provêm da agricultura e silvicultura, abrangendo os resíduos agroindustriais, resíduos florestais, resíduos sólidos urbanos, entre outros. Eles são considerados os biorrecursos mais abundantes para a complementação dos combustíveis nas refinarias de petróleo (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Neste cenário, pelo fato da economia brasileira ser movida principalmente pelo agronegócio, torna-se de suma importância a utilização desse tipo de resíduo na geração de energia sustentável (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, com composição e porcentagens variando entre as espécies de plantas (Figura 1).

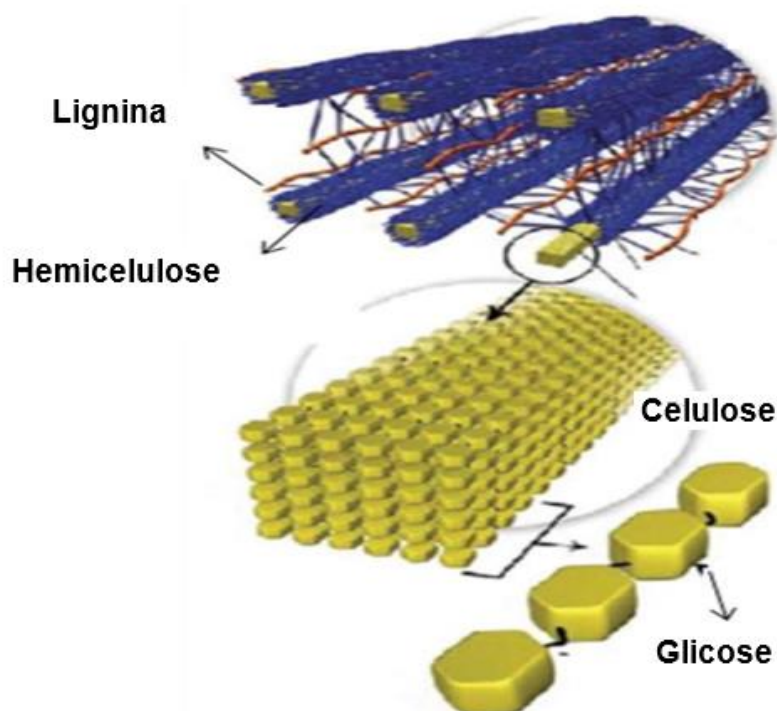


Figura 1 - Arquitetura da parede celular contendo celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: Adaptado de ALBUQUERQUE (2013).

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose anidra ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas. Possui alto grau de polimerização e suas moléculas formam microfibrilas estabilizadas por ligações de hidrogênio, tornando a

macromolécula cristalina e de estrutura rígida difícil de hidrolisar (FENGEL; WEGENER; DE GRUYTER, 1989).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por monômeros de D-glicose, D-manose, D-galactose, D-xilose e L-arabinose. Geralmente se apresenta de forma ramificada e possui baixo grau de polimerização, sendo fáceis de hidrolisar (FENGEL; WEGENER; DE GRUYTER, 1989). A xilose e a arabinose são as principais pentoses liberadas na hidrólise hemicelulósica (ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017).

Outro componente da biomassa vegetal é a lignina, uma macromolécula aromática que apresenta grande variabilidade na sua composição de acordo com a espécie de planta ou célula que é encontrada (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; BONAWITZ; CHAPPLE, 2010). Comparando com os outros polímeros citados, a lignina é a mais diversa estruturalmente nas suas ramificações e tipos de ligações (WHETTEN et al., 1998). A lignina é formada a partir de três álcoois: álcool p-coumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (WHETTEN et al., 1998). Quando essas moléculas são incorporadas às ligninas passam a serem referidas como p-hidroxifenil, guaiacil e siringil, respectivamente (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

A conversão da biomassa vegetal em etanol depende de três etapas principais, sendo elas: o pré-tratamento, a hidrólise e a fermentação. O pré-tratamento é necessário para fracionar a lignocelulose e separar a lignina dos polissacarídeos da biomassa, tornando a celulose e hemicelulose acessíveis para hidrólise. Geralmente são realizados com a adição de produtos químicos (ácidos, bases combinadas a agentes oxidantes e solventes orgânicos) e/ou métodos físicos (temperatura e pressão)(KUMAR, P. et al., 2009).

A hidrólise dos polissacarídeos pode ser catalisada enzimaticamente ou quimicamente, e a fermentação pode ser feita após as duas primeiras etapas ou, como em alguns processos integrados, juntamente à sacarificação. A liberação dos açúcares monoméricos nos hidrolisados vem acompanhada de uma variedade de compostos inibitórios, que afetam o crescimento e a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e outros microrganismos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Como o perfil dos inibidores lignocelulósicos é específico para cada tipo de pré-tratamento e

biomassa, é importante desenvolver estudos de fermentação mais direcionados a composição de cada hidrolisado.

1.3 A FERMENTAÇÃO POR LEVEDURAS

Leveduras são microrganismos unicelulares, eucariotos, heterotróficos, imóveis e com parede celular bem definida. Pertencem ao reino Fungi e, em sua maioria, estão organizados dentro do grupo dos Ascomicetos. Esses fungos possuem grande heterogeneidade no tamanho celular, forma, cor e reprodução, podendo haver grandes diferenças em indivíduos de mesma linhagem (FERNANDES, 2009).

Dentro desse grupo encontra-se a *S. cerevisiae* – conhecida popularmente como fermento –, uma espécie de levedura que foi descoberta em 1837 (MEYEN) no malte, o que resultou na escolha do seu nome, dado por sua intrínseca conexão na fabricação de cerveja. Há registros de fabricação de cerveja em civilizações da Suméria e Babilônia que datam cerca de 6000 a.C., trazendo a possibilidade de o fermento ter sido o organismo domesticado mais antigo (FELDMANN et al., 2012).

A capacidade desses microrganismos de fermentar açúcares em álcool representa o principal processo biotecnológico do mundo. Além de seu papel na produção de bioetanol e bebidas, *S. cerevisiae* é responsável pela fabricação de muitos outros produtos como: aromatizantes, agentes corantes, agentes de biocontrole, enzimas, probióticos, proteínas terapêuticas, produtos químicos e biofarmacêuticos. Com isso, *S. cerevisiae* é considerada, incomparavelmente, o principal microrganismo da civilização humana (MONEY, 2018).

S. cerevisiae é versátil e bem caracterizada como um microrganismo industrial (KAVŠČEK et al., 2015). Proporciona alto rendimento na produção de etanol a partir de açúcares hexoses (C6), atingindo até 90% dos rendimentos teóricos (KASAVI et al., 2012). Outras características que a colocam como o organismo preferido das indústrias é a sua capacidade de tolerar tensões no processo fermentativo, incluindo a inibição de alguns subprodutos, estresse osmótico e de pH, tolerância a altas

concentrações de etanol e de condições extremas de crescimento (VAN BEILEN, 2010).

Esses microrganismos são anaeróbicos facultativos, mas o metabolismo fermentativo predomina sobre o respiratório quando as concentrações de açúcares (hexoses) estão elevadas, mesmo sob condições aeróbicas. Este comportamento é provocado por um efeito conhecido como repressão catabólica, no qual as altas concentrações de glicose inibem a expressão de genes da via respiratória, fazendo com que o piruvato seja reduzido a etanol pela fermentação (TREVISOL et al., 2011).

Durante a fermentação, 12 enzimas estão envolvidas na conversão de glicose (C6) ao etanol e CO₂: 10 enzimas na degradação da glicose ao piruvato, com geração de ATP para o crescimento das leveduras, e mais duas enzimas-chave (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase) que convertem o piruvato nos produtos finais de fermentação e mantêm o seu equilíbrio redox (WALKER; WALKER, 2018) (Figura 2).

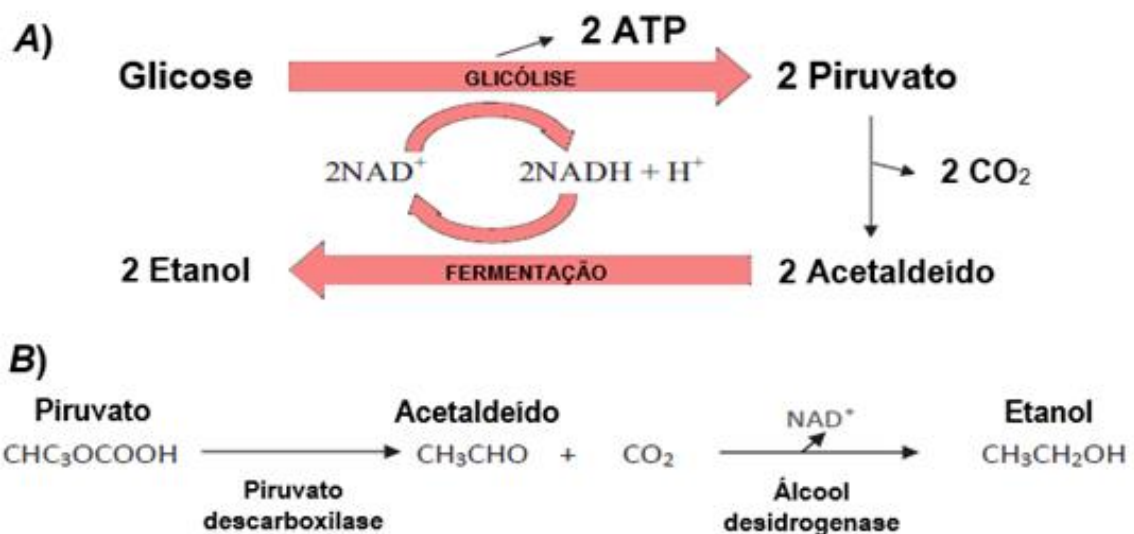


Figura 2 - Fermentação em leveduras. A) Resumo da glicólise e fermentação em leveduras. B) Últimas reações enzimáticas da fermentação de leveduras. Fonte: Adaptado de WALKER (et al., 2018).

A existência de diversos fatores e mudanças que ocorrem no meio fermentativo pode ameaçar a sobrevivência da célula e impedir que ela se desenvolva no seu potencial ótimo (GASCH, 2003).

O processo fermentativo em hidrolisados lignocelulósicos é desafiador para as leveduras, pois além de possuírem inibidores resultantes do processo, contêm quantidades significativas de pentoses (5C) que não são utilizadas eficientemente por cepas selvagens de *S. cerevisiae* para produção de etanol (STAMBUK et al., 2008). Para resolver esse problema, leveduras geneticamente modificadas são necessárias para metabolização desses açúcares (5C). As modificações que têm sido usadas são: a clonagem de uma xilose redutase (XR) e uma xilitol desidrogenase (XDH) do organismo ou a clonagem de uma xilose isomerase (XI). Ambas as alterações convertem a xilose em xilulose, sendo metabolizados pela levedura (MOYSÉS et al., 2016).

1.4 OS INIBIDORES E SEUS EFEITOS EM *S. cerevisiae*

A formação dos compostos inibitórios da fermentação depende da fonte de biomassa vegetal utilizada e do tipo do pré-tratamento aplicado (PIENKOS; ZHANG, 2009). Os três principais grupos de inibidores presentes nos hidrolisados são os (I) ácidos fracos, como ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico; os (II) furanos, incluindo furfural e hidróximetil furfural (HMF); e os (III) compostos fenólicos como vanilina, coniferil aldeído e ácido 4-hidroxibenzóico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000) (Figura 3).

Os ácidos fracos podem ser produzidos de duas maneiras, o ácido acético pela desacetilação das hemiceluloses, e os ácidos fórmico e levulínico pela degradação do HMF e furfural (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Geralmente, o ácido acético está presente em altas concentrações nos hidrolisados, variando de 1 a 10 g/L dependendo da biomassa e do método utilizado no pré-tratamento (ALMEIDA et al., 2007). O ácido fórmico normalmente é encontrado em concentrações mais baixas que o ácido acético, mas é relatado como sendo mais tóxico para a levedura *S. cerevisiae* (GARCÍA-APARICIO et al., 2006; MARTIN et al., 2007).

Ácidos fracos não carregados são lipossolúveis e difundem-se facilmente na membrana plasmática dos microrganismos. Ao entrarem na célula que possui o pH

neutro, se dissociam em prótons e ânions causando a acidificação citosólica (PALMQVIST et al., 1999). Para neutralizar essa acidificação, a célula de levedura bombeia os prótons em excesso para o meio extracelular através de ATPases localizadas na membrana celular (GIANNATTASIO et al., 2013). Esse mecanismo de resposta demanda o gasto de moléculas de ATP, podendo resultar na redução do crescimento celular e no desempenho da fermentação (GIANNATTASIO et al., 2013; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

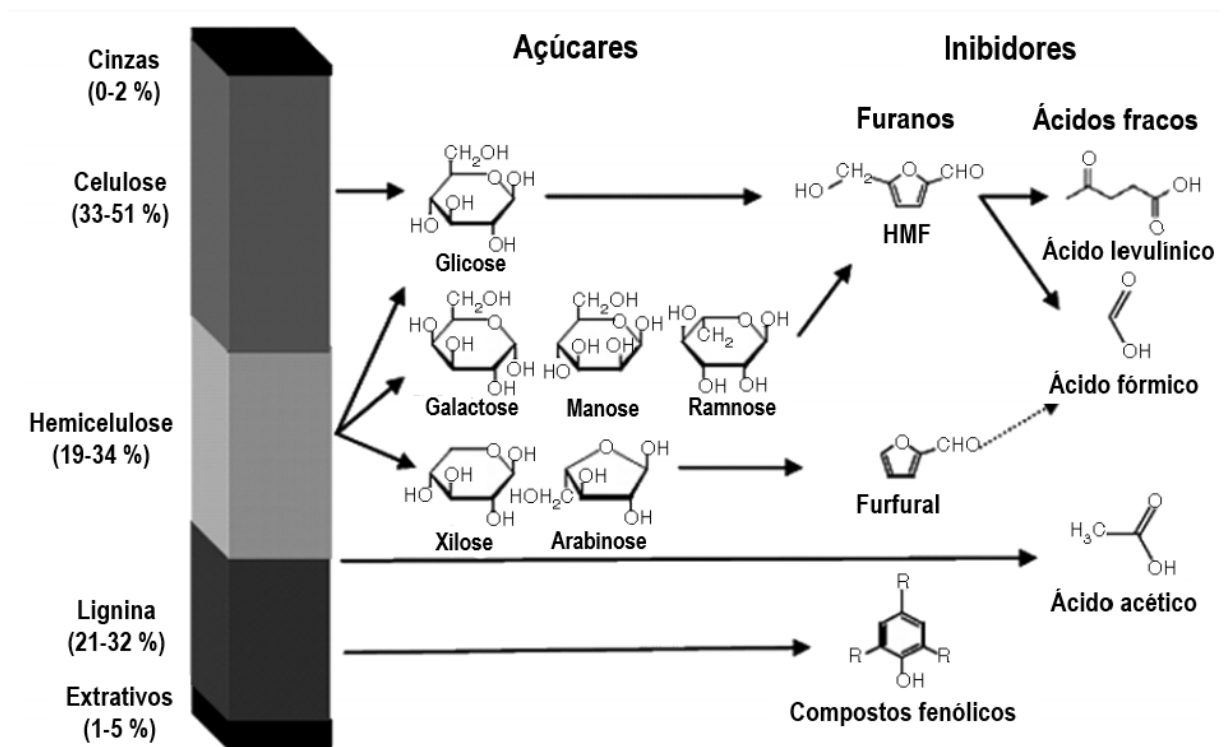


Figura 3 - Média da composição de biomassas lignocelulósicas, e os açúcares e compostos inibitórios resultantes do pré-tratamento e hidrólise. Fonte: Adaptado de Almeida (et al., 2007).

Alguns ácidos fracos, como o ácido salicílico, também podem se dissolver na matriz mitocondrial e prejudicar o gradiente de prótons da cadeia transportadora, alterando o potencial de membrana e inibindo a síntese de ATP (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Além disso, o metabolismo celular pode ser prejudicado pela inibição da atividade de algumas enzimas-chave da glicólise, causada pelo acúmulo de ânions no citosol (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

Os compostos fenólicos são moléculas sintetizadas pelo metabolismo secundário das plantas através das vias da pentose fosfato, shiquimato e fenilpropanóide (RANDHIR

et al., 2004). Esses compostos estão envolvidos em processos fisiológicos e mecanismos de defesa das plantas contra infecções de microrganismos, além de constituírem os blocos construtores da lignina (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010; BLUM; SHAFER; LEHMAN, 1999).

A concentração dos compostos nos hidrolisados varia de acordo com a fonte de biomassa e do método aplicado no pré-tratamento (PÉREZ et al., 2002). Geralmente, a mistura é composta por ácidos fenólicos, alcoóis fenólicos e cetonas fenólicas, resultantes da degradação da lignina (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014). Todos podem se comportar como inibidores de células, mas os aldeídos e cetonas exercem mais inibição que os ácidos, que por sua vez são mais inibitórios que os alcoóis para *S. cerevisiae* (KLINKE et al., 2003; LARSSON et al., 2000).

Os mecanismos de inibição destes compostos em *S. cerevisiae* não foram completamente esclarecidos, devido à grande heterogeneidade do grupo (ALMEIDA et al., 2007). Sabe-se que eles causam danos na integridade das membranas biológicas, afetando a capacidade de atuarem como barreiras seletivas e matrizes de enzimas. Os efeitos inibitórios nas leveduras são específicos para cada composto, podendo prejudicar o crescimento celular, prolongar a fase *lag* e reduzir o rendimento do etanol (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014).

Os derivados de furano, 5-hidroximetil-furfural e furfural, são formados pela desidratação de hexoses e pentoses, respectivamente. Os níveis desses compostos nos hidrolisados também alteram de acordo com a matéria-prima e o método de pré-tratamento (ALMEIDA et al., 2007; ULBRICHT; NORTHUP; THOMAS, 1984). Geralmente, o furfural se encontra em concentrações mais baixas que o HMF, porém concentrações em torno de 1 g/L já são suficientes para exercer inibição nas leveduras (ALMEIDA et al., 2007).

Furfural e HMF podem afetar o crescimento e a produção de etanol dos microrganismos pela inibição de enzimas importantes do metabolismo como a álcool desidrogenase, a piruvato desidrogenase e a aldeído desidrogenase (TAHERZADEH et al., 2000). A molécula de furfural ainda pode exercer danos a membrana celular (ALMEIDA et al., 2007).

Durante a fermentação, a levedura *S. cerevisiae* pode reduzir o furfural e o HMF a alcoóis que são menos tóxicos para as células (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), como o álcool furfurílico e 2,5-bis-hidroximetilfurano, respectivamente (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). O potencial inibitório desses compostos é comumente analisado isoladamente, porém sua combinação pode representar um desafio maior para as células (VAN MARIS et al., 2006).

A inibição do desempenho fermentativo das leveduras pelos principais grupos de inibidores lignocelulósicos é um enorme obstáculo para a produção em larga escala de etanol de segunda geração (ALMEIDA et al., 2007). Estratégias como a desintoxicação (remoção dos inibidores) dos hidrolisados é frequentemente utilizada para aumentar a fermentabilidade. Entretanto, deve ser evitada pelo custo adicional no processo de produção do etanol (VON SIVERS et al., 1994) e à possível retirada de açúcares fermentáveis do meio (RIVARD et al., 1996). Pensando nisso, entender quais os compostos mais inibitórios dentro de um hidrolisado pode ser uma ferramenta útil para seleção de cepas mais resistentes a eles ou, até mesmo, o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados para suportar suas concentrações.

1.5 A CASCA DE COCO VERDE

O coqueiro (*Cocos nucifera*) está sendo cultivado em diversos países ao redor do mundo, principalmente na Indonésia, Filipinas, Índia, Brasil e Tailândia, que produzem mais de 80% da produção mundial de coco. No ano de 2017, aproximadamente 60,7 milhões de toneladas desse fruto foram produzidas, dos quais 2,8 milhões de toneladas foram colhidos no Brasil, numa área de plantações em torno de 287.000 ha (FAOSTAT, 2017).

A indústria alimentícia utiliza cocos para obter vários produtos como óleo de coco, coco seco, coco ralado, leite de coco e água de coco (MARTINS; JESUS JR, 2014), mas descarta sua casca como lixo. A casca de coco abrange de 80% a 85% do peso do fruto, o que resulta em grandes quantidades de resíduos despejados no ambiente.

Cerca de 70% do lixo gerado nas praias do Nordeste do Brasil é composto por cascas de coco verde (EMBRAPA, 2004).

É importante destacar também que a casca do coco tem um alto teor de lignina, tornando-a de difícil decomposição no ambiente. Além disso, sua degradação libera compostos fenólicos tóxicos para humanos e animais, que podem penetrar o solo e poluir os lençóis freáticos (ANKU; MAMO; GOVENDER, 2017). Devido à enorme quantidade desses resíduos no meio ambiente (CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002), o uso dessa biomassa na produção de etanol 2G constitui uma solução possível e sustentável. Inclusive, essa produção pode ser uma maneira de beneficiar o desenvolvimento rural, pois o coco é obtido principalmente por pequenos produtores.

Para resolver esse problema de poluição ambiental, estudos para uso sustentável da casca de coco têm sido realizados. SOARES e colaboradores (2017) desenvolveram um pré-tratamento alcalino utilizando o mesocarpo do coco verde que resultou numa alta concentração de açúcares. Em 2019, BOLIVAR-TELLERIA adaptou o processo melhorando a hidrólise enzimática e aumentou o teor de açúcares no meio, porém os títulos de etanol produzidos na fermentação continuaram os mesmos.

Uma maneira de ampliar o conhecimento sobre esse resíduo é analisar o comportamento das leveduras frente aos compostos inibitórios do hidrolisado do coco verde, pois eles interferem no crescimento desses microrganismos e no processo fermentativo, afetando a concentração final do etanol.

Considerando o impacto que os compostos inibitórios têm no crescimento e na fermentação dos microrganismos, torna-se crucial investigar os seus efeitos individuais e aditivos deles nas mesmas concentrações que geralmente são encontrados, para aprimorar estratégias que possam aumentar viabilidade econômica da produção do etanol 2G.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os principais efeitos dos potenciais inibidores dos hidrolisados da casca de coco verde no processo de fermentação utilizando a cepa G2-104, uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para produção de etanol de segunda geração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o crescimento da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético, ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzoico, separados e em associação;
- Avaliar o perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético, ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzoico, separados e em associação;
- Calcular e analisar o rendimento e produtividade de etanol da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético, ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzoico, separados e em associação;
- Avaliar o perfil fermentativo da linhagem G2-104 no hidrolisado de coco com diferentes concentrações de ácido acético, ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzoico;
- Calcular e analisar o rendimento e produtividade de etanol da cepa G2-104 no hidrolisado de coco com diferentes concentrações de ácido acético, ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzoico, separados e em associação;

3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

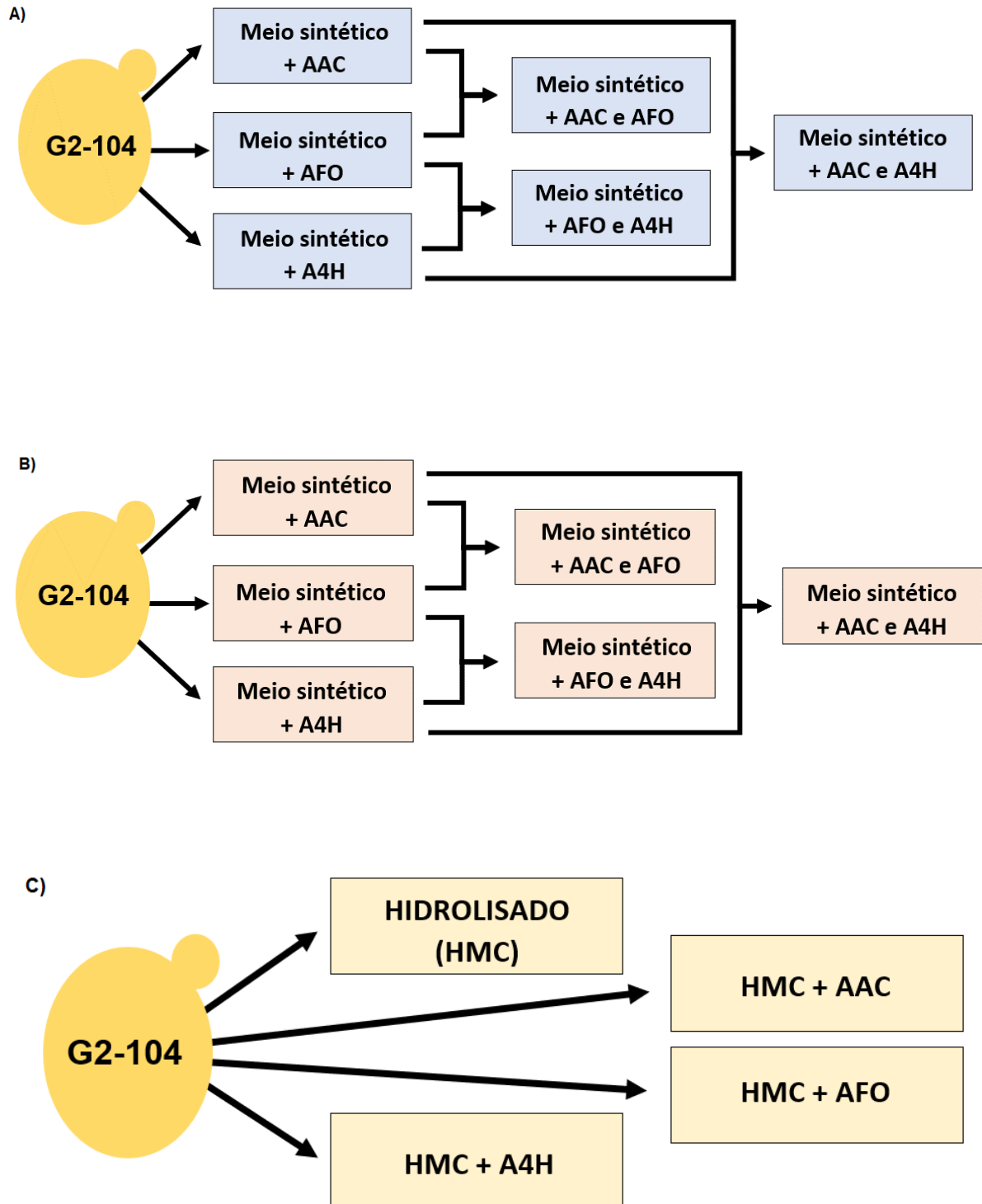


Figura 4 - Fluxograma do delineamento experimental. A) Teste de crescimento em meio sintético com inibidores; B) Fermentação em meio sintético com inibidores; C) Fermentação do hidrolisado da casca de coco verde com inibidores. Siglas: AAC = Ácido acético; AFO = ácido fórmico; A4H = ácido 4-hidroxibenzoico; HMC = Hidrolisado do mesocarpo da casca de coco verde.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LEVEDURA

A cepa de *S. cerevisiae* utilizada nesse estudo é a G2-104, que se encontra armazenada em meio YPDX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica, 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose) suplementado com 30% (v/v) de glicerol a -80°C, no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), Universidade Federal do Espírito Santo. Essa levedura foi modificada geneticamente para consumir de xilose e foi desenvolvida (sob sigilo) para produção de etanol 2G pelo Laboratory of Molecular Cell Biology, KU Leuven, Flanders, Bélgica. A G2-104 é derivada da cepa Ethanol Red – uma levedura industrial etanologênica muito utilizada em estudos sobre fermentação – e foi selecionada pela sua alta capacidade fermentativa.

4.2 INÓCULOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Todos os experimentos foram iniciados a partir de pré-inóculos cultivados em meio de cultura YPDX, incubados à 30 °C por 48 horas com agitação de 200 rpm. Antes dos testes de crescimento em microplacas, a linhagem G2-104 foi crescida em YPDX até atingir a DO_{600nm} 1,0, que corresponde à sua fase exponencial de crescimento. Já para o teste de fermentação que precisa de uma concentração maior de células, a levedura foi crescida em YPDX até a fase exponencial tardia e os experimentos iniciados na DO_{600nm} 4,0.

4.3 INIBIDORES

Os compostos inibitórios e a faixa das suas concentrações utilizados neste trabalho foram escolhidos baseados em estudos anteriores sobre a composição dos hidrolisados alcalinos do mesocarpo de coco verde (SOARES et al., 2016, 2017). O efeito do ácido acético foi avaliado nas concentrações de 3 g/L, 7 g/L e 9 g/L; do ácido fórmico nas concentrações de 2 g/L, 6 g/L e 9 g/L; e do ácido 4-hidróxibenzoico, foram testadas as concentrações de 0,1 g/L, 0,2 g/L e 0,5 g/L. Os inibidores foram adicionados em meio sintético líquido YNB (6,7 g/L de base nitrogenada em água destilada) e o pH ajustado para 5,0 com NaOH a 5 M. A quantidade de açúcar adicionada foi de acordo com cada experimento.

Cada inibidor foi testado individualmente e em associação no meio YNB, tanto no crescimento quanto na fermentação da cepa G2-104. Todos os experimentos tiveram o pH inicial ajustado para 5,0.

4.4 TESTE DE CRESCIMENTO

O teste de crescimento da levedura na presença dos inibidores foi realizado utilizando um leitor de microplacas Synergy™ HT Multi-Detection Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT). Células da cepa G2-104 foram crescidas até a DO_{600nm} 1,0 em YPD_X, colhidas por centrifugação (5 min. a 3000xg), lavadas em água destilada estéril, centrifugadas novamente e ressuspensas em meio YNB (6,7 g/L de base nitrogenada de levedura, 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose).

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica, no qual células de pré-cultivos independentes eram inoculadas em 400µl de meio contendo as concentrações de cada inibidor – individualmente e em associação – a uma DO_{630nm} inicial entre 0,2 - 0,5. O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços, que eram incubadas no leitor pré-ajustado para manter a temperatura de 30 °C por 48 horas.

As curvas de crescimento foram monitoradas através do Software Gen5™, que media a densidade óptica no comprimento de onda de 630_{nm} em intervalos 15 min. Os dados foram baixados em planilhas do Excel e convertidos em gráficos pelo programa *SciDavis* para melhor visualização e análise.

4.5 TESTE DE FERMENTAÇÃO

Fermentações semi-anaeróbicas em meio sintético com inibidores foram conduzidas em frascos de vidro (50 mL) contendo 10 mL como volume de trabalho (Figura 5). Os frascos eram fechados com tampas de borracha e vedados com Parafilm M®, material que permite troca gasosa e impede o acúmulo de CO₂. Os pré-cultivos deste teste foram cultivados em YPDx (líquido) por 16 horas. Logo após, foram centrifugados por 5 min a 3000xg, lavados com água destilada autoclavada e ressuspensos em YNB. Os meios sintéticos utilizados nesse experimento foram preparados com 24 g/L de glicose e 6 g/L de xilose, que corresponde a uma média da relação de hexoses e pentoses encontradas nos hidrolisados lignocelulósicos.



Figura 5 - Teste de fermentação em meio sintético realizado em frascos de 50 mL.

A fermentação foi iniciada na $DO_{600nm} = 3,5 - 4,0$ e as culturas incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48h com agitação de 100 rpm, uma rotação que não chega a oxigenar o meio mas é suficiente para suspender as células da levedura e evitar sua sedimentação. As amostras foram retiradas (500 μL) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48h e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises do consumo dos açúcares e produção de etanol.

4.6 HIDROLISADO DA CASCA DE COCO VERDE

4.6.1 Obtenção e produção do pó do mesocarpo

As cascas de coco verde utilizadas neste estudo foram fornecidas gentilmente pelos comerciantes de água de coco do litoral da cidade de Vitória/ES, Brasil. No laboratório (LBAA) os frutos eram lavados com água e detergente, para limpeza do material antes da extração do mesocarpo. Para utilização do mesocarpo do fruto, o epicarpo era retirado manualmente com uma faca serrilhada e o mesocarpo era extraído em lascas até o epicarpo. Depois da extração, o mesocarpo foi seco em estufa na temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que a umidade se encontrasse abaixo de 5% (p/p). Em seguida, o mesocarpo foi moído em um disco vibratório por 90 segundos a uma velocidade de 1100 rpm para obtenção do pó, que foi peneirado numa peneira de $212\text{ }\mu\text{M}$ e armazenado na geladeira até a utilização

4.6.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino do hidrolisado de coco verde foi produzido adicionando o pó do mesocarpo a uma solução de NaOH a 1% (m/v), a carga sólida da biomassa utilizada neste tratamento é de 18% (m/v). A mistura foi feita em frascos erlemeyer e deixada em um shaker com agitação de 200 rpm durante 1 hora na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. No fim desse tempo, ajustou-se pH do meio para 5,0 com H_2SO_4 , adicionou-

se 0,05g de PEG4000 para cada grama de biomassa e foi mantido a 50 °C por 2 horas com agitação de 200 rpm.

4.6.3 Hidrólise enzimática

Para realização da hidrólise enzimática, utilizou-se um coquetel enzimático Cellic® CTec 2 da Novozymes, que é composto por celulases, β -glicosidases e hemicelulase. A dosagem do coquetel acrescentado ao meio é de 0,05 – 0,50% p/p (g enzima/g celulose). A sacarificação ocorreu durante 24 horas na temperatura de 50 °C em uma agitação de 200 rpm. Logo após esse processo, o meio foi filtrado a vácuo, autoclavado e armazenado na geladeira. Para a fermentação deste hidrolisado, acrescentou-se ureia (2 g/L) como fonte de nitrogênio para levedura.

4.7 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO VERDE

A cepa G2-104 também teve sua fermentação avaliada no hidrolisado do mesocarpo de coco verde com a adição dos inibidores (ácido acético, ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzóico) ao meio. Após o preparo dos hidrolisados, alíquotas de 9 mL foram distribuídas em frascos de vidro de 50 mL. Nos tratamentos, adicionou-se as concentrações de 7 g/L de ácido acético, 6 g/L de ácido fórmico e 0,2 g/L de ácido 4-hidroxibenzóico, separadamente. Cada inibidor foi diluído em 1 mL de água e adicionado nos frascos com o hidrolisado completando o volume final de trabalho de 10 mL. Nos controles, apenas água destilada foi adicionada.

O experimento decorreu por 48 horas com as mesmas condições dos experimentos de fermentação já descritos anteriormente. As amostras também foram retiradas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas e armazenadas a -20 °C para as análises posteriores



Figura 6 - Teste de fermentação do hidrolisado realizado em frascos de 50 mL.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇUCARES E ETANOL

Amostras coletadas nos experimentos de fermentação da cepa G2-104, dos meios sintéticos e do hidrolisado, foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi diluído 10X em água ultrapura e filtrado com um filtro de seringa PES de 0,22 μ M antes das análises.

Realizou-se a análise dos açúcares e do etanol por cromatografia líquida de alta eficiência usando uma unidade de HPLC Shimadzu (LC-20AT Prominence, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As concentrações dos compostos foram determinadas utilizando uma coluna Resex ROA-Ácidos Orgânicos (300 x 7,8 mm) com detecção por índice de refração (RID-10A). Um volume de 10 μ L das amostras preparadas era injetado na coluna cromatográfica. As moléculas foram eluídas no modo isocrático com a taxa de fluxo de 0,6 mL/min., utilizando solução de 2,5 mmol/L de H₂SO₄ a 60 °C como fase móvel. Os cálculos foram realizados com o software LCSolution versão

1.25 SP2 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e as curvas padrão para glicose, xilose, manose e etanol foram feitas na faixa de 0,1 e 10 g/L.

4.9 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTOS

O rendimento do etanol ($Y_{p/s}$) foi calculado dividindo a maior concentração de etanol encontrada pelos açúcares consumidos até o momento. Para determinar a taxa de produtividade volumétrica do etanol (Q_p), a concentração de etanol dividia pelo tempo de fermentação de 12 horas, que corresponde à fase de maior produção de etanol nos experimentos (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DOS INIBIDORES NO CRESCIMENTO DE *S. cerevisiae*

Com o objetivo de investigar se os compostos inibitórios exercem efeitos característicos no padrão de crescimento de *S. cerevisiae*, cultivou-se a cepa G2-104 em meio sintético (YNB) na presença de diferentes concentrações de ácido acético (AAC), ácido fórmico (AFO) e ácido 4-hidroxibenzóico (A4H). O meio sintético de cultivo é utilizado em importantes estudos sobre a avaliação de resposta de *S. cerevisiae* a inibidores (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014; VERDUYN et al., 1992). Este meio foi escolhido por ser composto apenas com os nutrientes essenciais para o crescimento de leveduras. Dessa forma, os experimentos foram planejados com o intuito de reduzir o número de compostos no ensaio e diminuir o risco dos inibidores reagirem com outras moléculas do meio. Os inibidores foram adicionados separadamente nesta etapa e o perfil de crescimento foi analisado por 48 horas em um leitor de microplacas (Figura 7).

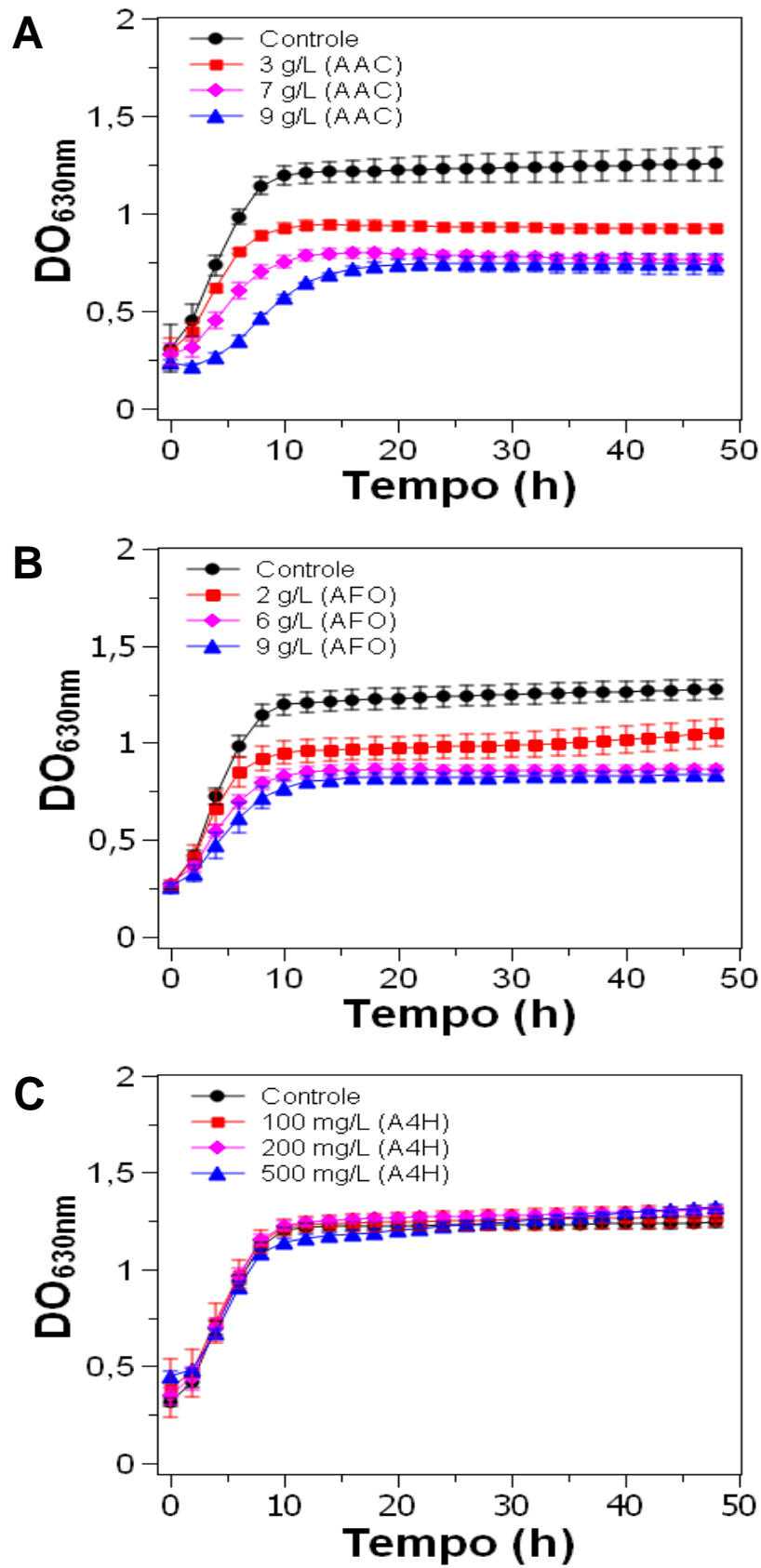


Figura 7- Curva de crescimento da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes inibidores. (A) ácido acético em YNB; (B) ácido fórmico em YNB; (C) ácido 4-hidroxi benzóico em YNB.

A linhagem apresentou perfis de crescimento distintos entre os três inibidores avaliados neste experimento. Na presença de ácido acético, o crescimento máximo da levedura diminuiu de acordo com o aumento da concentração do ácido, com uma sobreposição na concentração final de células nos testes com 7 g/L e 9g/L (AAC) (Figura 7A). Esses resultados se assemelham ao que HELLE (et al., 2003) obteve ao examinar o efeito de ácido acético no desempenho de uma cepa geneticamente modificada para produção de etanol 2G. A concentração utilizada no estudo foi de 3 g/L de ácido sob o pH 3,5 ou 5, e em ambas condições a taxa de crescimento máxima foi afetada pelo inibidor.

CASEY (et al., 2010) observou diminuições significativas na concentração máxima de biomassa de *S. cerevisiae* na presença de ácido acético. Os testes foram feitos com diferentes concentrações do ácido e sob diferentes valores de pH controlado, onde perceberam que a medida que o pH era aumentado, o efeito inibitório foi reduzido. Esses resultados estão relacionados à quantidade de ácido acético não dissociado no experimento, sendo que quanto maior o pH menos moléculas de ácidos não carregados vão estar no meio.

No presente trabalho (Figura 7A), o perfil da curva de crescimento da levedura também sofreu alteração após a adição de 9 g/L de ácido acético, onde nota-se um alongamento da fase adaptativa (*lag*) da cepa nas 6 horas iniciais. Em um recente estudo com cepas modificadas para consumo de xilose, quando adicionou-se 10 g/L de ácido acético também foi observado essa fase de atraso do crescimento no período de 6 horas (KO; UM; LEE, 2016). A fase *lag* é conhecida como um período de ajuste no qual uma determinada população de microrganismos se adapta a um novo meio antes de começar a crescer exponencialmente (MEDAWAR; STREHAIANO; DÉLIA, 2003; SWINNEN et al., 2004). No entanto, a cepa foi inoculada durante a fase exponencial do seu crescimento, – como mostrado no perfil de crescimento do controle – indicando que o meio se tornou estressante para o seu desempenho nesta concentração.

O perfil de crescimento da levedura com ácido fórmico em YNB mostrou que a adição deste ácido exerceu efeito negativo no seu crescimento (Figura 7B). A concentração final de células em todos os tratamentos foi menor que o demonstrado no controle, entretanto não houve o aparecimento de uma fase *lag* nas curvas avaliadas. Observa-

se que, em todos os testes, as culturas iniciaram crescendo na fase exponencial, ou seja, as células continuaram com o metabolismo voltado para o crescimento, apesar de não terem alcançado a taxa de crescimento que a população do controle atingiu.

No cultivo da cepa G2-104 com diferentes concentrações do ácido 4-hidroxibenzóico não houve diferenças fenotípicas no seu padrão de crescimento. Em todos os ensaios realizados, o crescimento se mostrou semelhante no perfil da curva e na concentração final de células do controle (Figura 7C). Esses resultados no crescimento são interessantes para utilização dos hidrolisados de coco verde, considerando que o mesocarpo do coco é rico em ácido 4- hidroxibenzóico (KATIHA et al., 2005).

Após realizar os cultivos da cepa G2-104 em meio sintético na presença dos inibidores individualmente, verificou-se o crescimento da levedura com os compostos inibitórios em associação. Os resultados apresentados na Figura 8 mostram os perfis de crescimento da cepa na adição de ácido acético (3 g/L, 7 g/L e 9 g/L) e ácido fórmico (2 g/L, 6g/L e 9 g/L); ácido acético (3 g/L, 7 g/L e 9 g/L) e ácido 4-hidroxibenzóico (100 mg/L, 200 mg/L e 500 mg/L); e ácido fórmico (2 g/L, 6g/L e 9 g/L) e ácido 4-hidroxibenzóico (100 mg/L, 200 mg/L e 500 mg/L).

As curvas de crescimento das culturas com a adição de ácido acético e ácido fórmico apresentou características únicas à medida que as concentrações destes inibidores eram acrescidas ao meio (Figura 8A). Nas concentrações de 3 g/L (AAC) e 2 g/L (AFO), o perfil de crescimento da levedura se assemelhou ao do controle nas primeiras horas do cultivo, mas a concentração final de células é notavelmente menor.

O padrão de crescimento da cepa cultivada com 7 g/L (AAC) e 6 g/L (AFO) mostra o aparecimento de uma fase *lag* com duração de aproximadamente 24 horas e um crescimento reduzido, evidenciando a toxicidade desses compostos na condição avaliada. Embora a população tenha crescido depois desta fase de adaptação, problemas como esses podem acarretar em outras complicações na fermentação industrial, como o crescimento de microorganismos contaminantes no meio e a perda de tempo no processo fermentativo, gerando despesas extras (FERREIRA et al., 2017). As concentrações de 9 g/L (AAC) e de 9 g/L (AFO) foram muito tóxicas para a levedura, impedindo o seu crescimento e indicando a morte das células no meio.

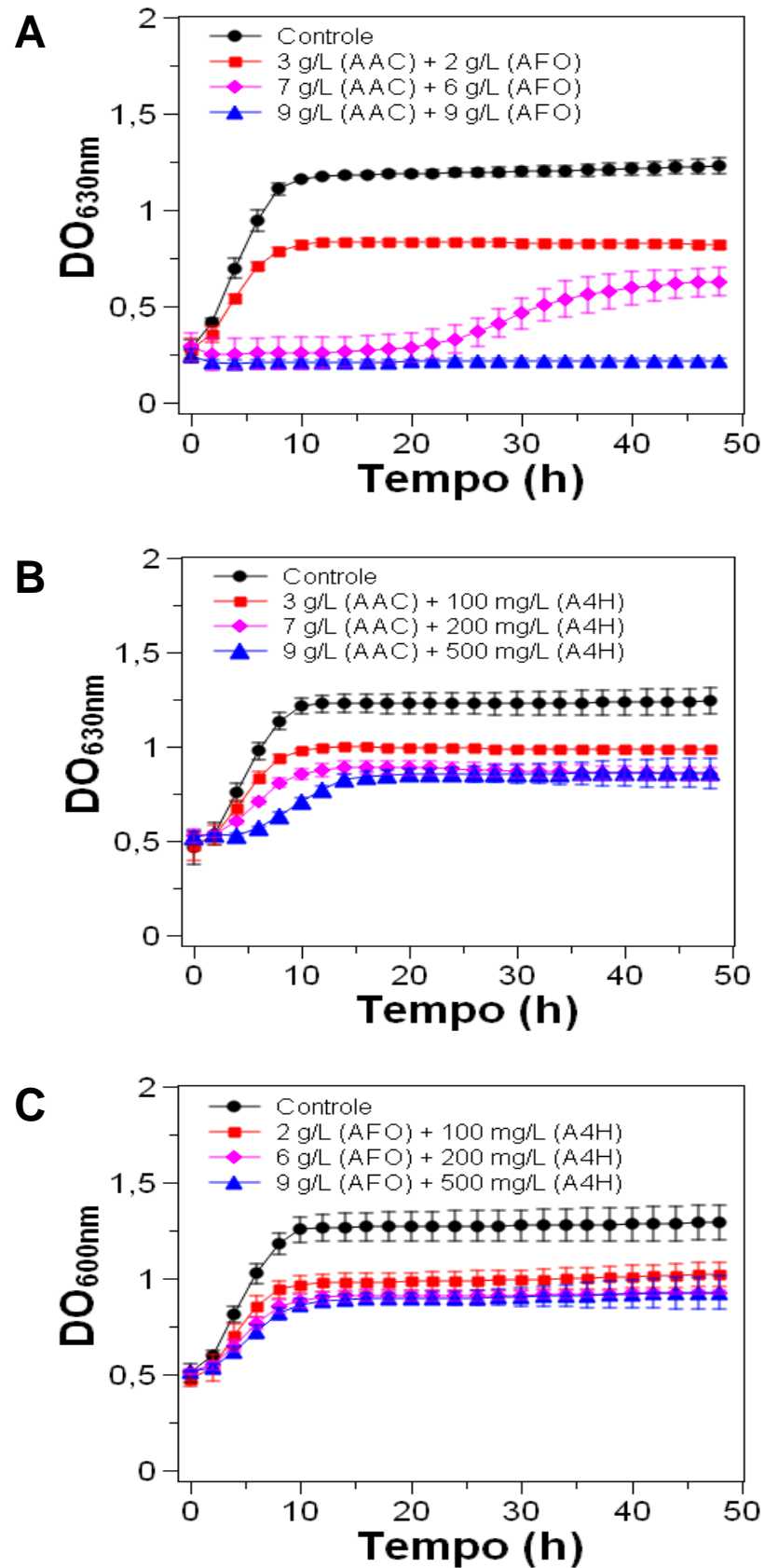


Figura 8 - Curva de crescimento da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações dos inibidores em associação. (A) ácido acético e ácido fórmico; (B) ácido acético e ácido 4-hidroxibenzóico; (C) ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzóico.

Quando os efeitos do ácido acético com ácido 4-hidroxibenzoico são avaliados juntos, o padrão de crescimento se assemelha ao que foi encontrado nos testes feitos com a adição individual do ácido acético em meio sintético. Observa-se que a concentração final de células foi maior no controle e diminuiu gradativamente com o aumento das concentrações dos inibidores (Figura 8B).

O perfil de crescimento da G2-104 com o acréscimo de ácido 4-hidroxibenzoico e ácido fórmico ao meio sintético seguiu o mesmo padrão encontrado nas curvas de crescimento com concentrações de ácido fórmico adicionado individualmente (Figura 8C). Dessa forma, os resultados evidenciaram que ácido 4-hidroxibenzoico não exerce efeito sinérgico com os ácidos acético e fórmico no perfil de crescimento. ADEBOYE e colaboradores (2014) mostraram que altas concentrações do ácido 4-hidroxibenzoico podem inibir a taxa de crescimento, mas não altera o perfil do crescimento com fases de atraso. Porém, eles avaliaram os efeitos de compostos fenólicos em concentrações próximas ao limite de toxicidade para *S. cerevisiae*, e no presente estudo, o objetivo foi avaliar os compostos nas suas concentrações comumente encontradas em hidrolisados do mesocarpo de coco verde.

5.2 EFEITO DOS INIBIDORES NO PERFIL FERMENTATIVO DE *S. cerevisiae*

Para verificar a influência dos compostos inibitórios no desempenho fermentativo da cepa G2-104, fermentações semi-anaeróbicas em meio sintético com inibidores foram realizadas. Como os compostos inibitórios podem apresentar efeitos diferentes do crescimento no perfil fermentativo de *S. cerevisiae*, acompanhou-se a fermentação da cepa monitorando o consumo de açúcares e a produção de etanol na presença dos inibidores durante 48 horas.

Nesta primeira etapa do experimento, a levedura foi avaliada na presença de ácido acético (Figura 9), ácido fórmico (Figura 10) e ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 11), que foram adicionados nas mesmas concentrações dos testes de crescimento. Por se

tratar de uma levedura de produção de etanol 2G, o ensaio foi preparado em meio YNB suplementado com glicose e xilose.

O perfil de consumo de açúcar nos testes com ácido acético (Figura 9) foi diferente nas três concentrações avaliadas. A glicose foi completamente consumida nas primeiras 12h com uso de 3 g/L de ácido acético, sendo que no tempo de 6h havia menor quantidade de glicose no meio que o controle (Figura 9B).

Na concentração de 7 g/L (AAC), nota-se um atraso no consumo de glicose, que se esgotou em aproximadamente 24h (Figura 9C). Na fermentação com 9 g/L de ácido acético, a hexose foi totalmente consumida apenas após ~48h. Mesmo havendo diferença no tempo de consumo de açúcar e produção de etanol, os títulos de todos os tratamentos foram semelhantes, atingindo ~10 g/L de etanol.

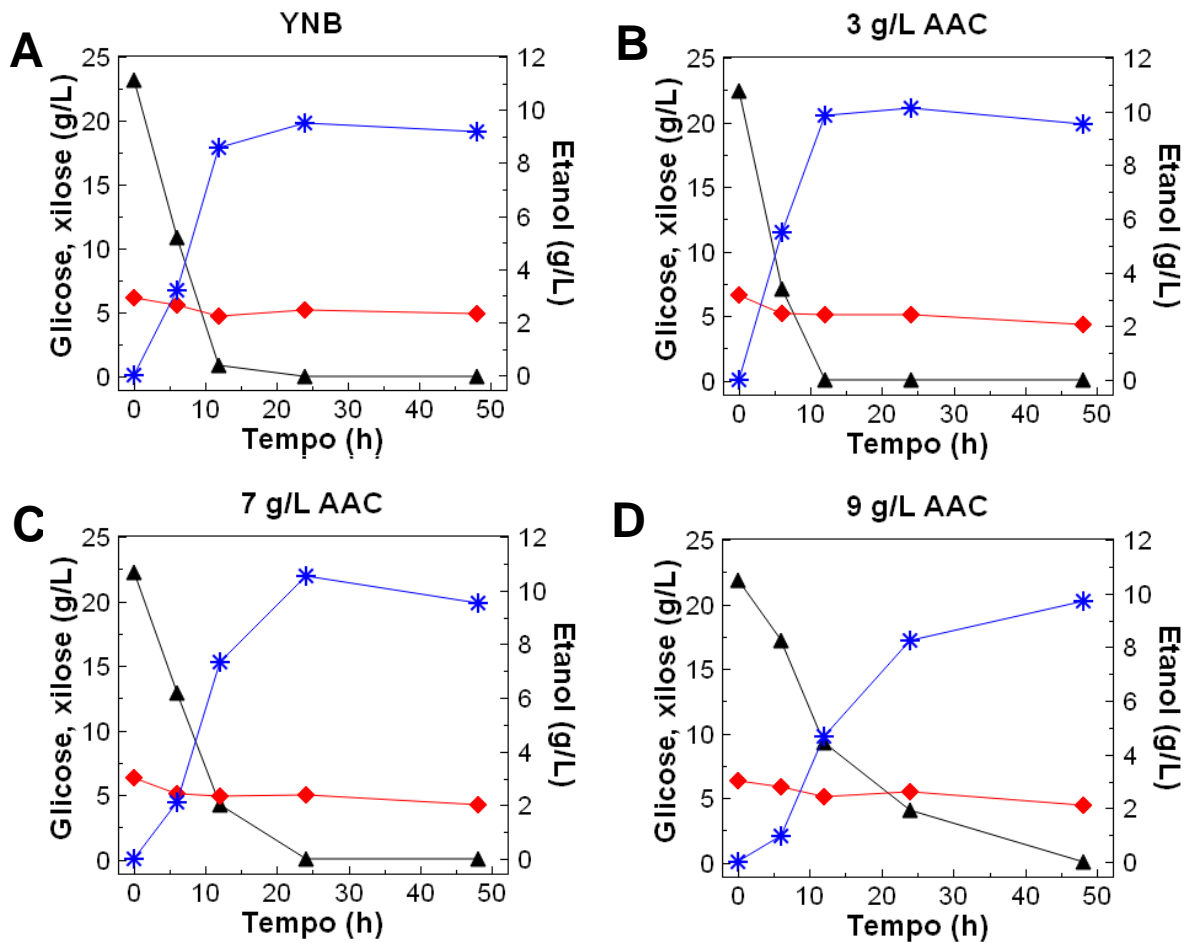


Figura 9 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de inibidores. (A) controle; (B) 3 g/L de ácido acético; (C) 7g/L de ácido acético; (D) 9 g/L de ácido acético. Símbolos: ▲ = Glicose; ◆ = Xilose; * = Etanol.

As fermentações da cepa G2-104 com ácido fórmico (nas concentrações de 2 g/L e 6 g/L) tiveram perfis semelhantes, consumindo toda a glicose e obtendo a maior concentração nas primeiras 12h do experimento (Figuras 10B e 10C). Os efeitos mostrados nos testes de crescimento com ácido fórmico, em que todas as concentrações avaliadas resultaram em curvas semelhantes, foram diferentes na fermentação. Neste experimento, observou-se o impacto da concentração de 9 g/L (AFO) no consumo de açúcar, que ao final de 48h de experimento, ainda havia aproximadamente de 10 g/L de glicose residual no meio (Figura 10D).

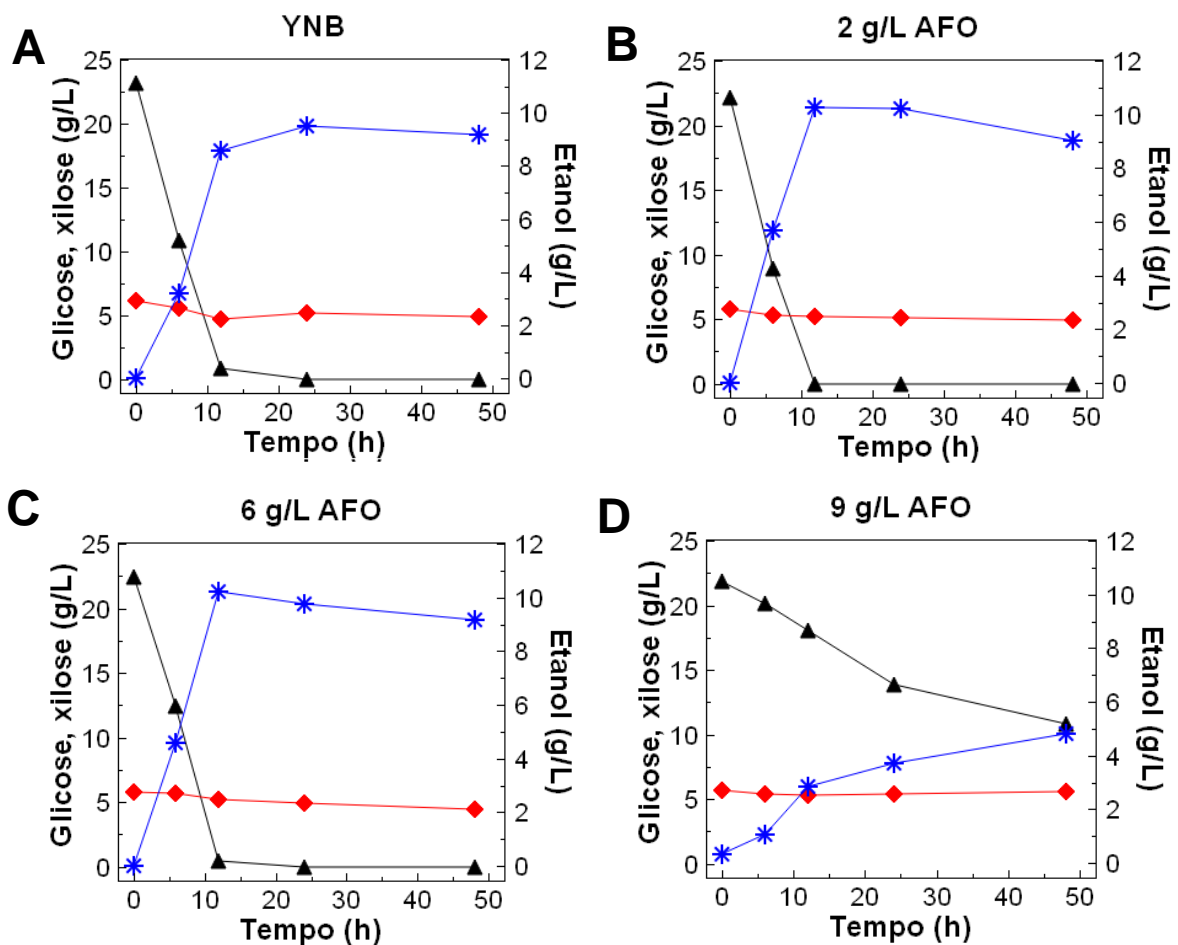


Figura 10 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido fórmico. (A) controle; (B) 2 g/L de ácido fórmico; (C) 6 g/L de ácido fórmico; (D) 9 g/L de ácido fórmico. Símbolos: ▲=Glicose; ◆=Xilose; * =Etanol

O ácido 4-hidroxibenzóico não provocou efeitos notáveis no perfil de fermentação quando comparado ao controle. A cepa G2-104 não exibiu diferenças visuais no perfil fermentativo nas diferentes concentrações de A4H (0,1 g/L, 0,2 g/L e 0,5 g/L) adicionados individualmente (Figura 11).

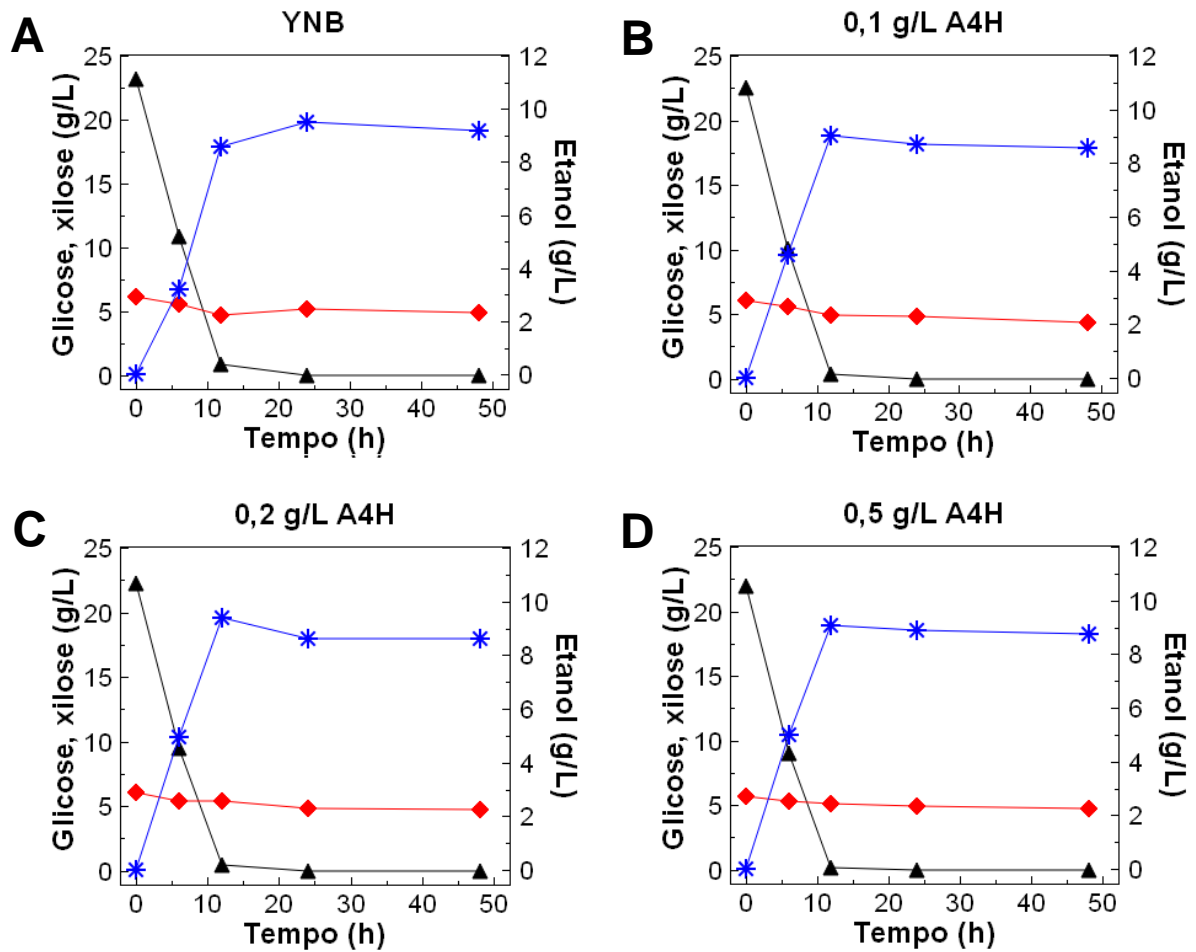


Figura 11 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido 4-hidroxibenzoico. (A) controle; (B) 0,1 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico; (C) 0,2 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico; (D) 0,5 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico. Símbolos: ▲=Glicose; ◆=Xilose; * =Etanol.

Com objetivo de verificar se os compostos em conjunto exercem efeitos de inibição diferentes dos exercidos individualmente no perfil fermentativo de *S. cerevisiae*, o desempenho da cepa G2-104 foi avaliado na presença dos inibidores em associação.

As mesmas concentrações dos compostos inibitórios do teste de crescimento foram utilizadas neste ensaio. Novamente os inibidores foram divididos em pares para a realização do teste, sendo: ácido acético (3 g/L, 7 g/L e 9 g/L) e ácido fórmico (2 g/L, 6g/L e 9 g/L); ácido acético (3 g/L, 7 g/L e 9 g/L) e ácido 4-hidroxibenzoico (0,1 g/L, 0,2 g/L e 0,5 g/L); e ácido fórmico (2 g/L, 6g/L e 9 g/L) e ácido 4-hidroxibenzoico (0,1 g/L, 0,2 g/L e 0,5 g/L). As amostras coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48h foram analisadas e os dados obtidos estão representados na forma de gráficos nas Figuras 12, 13 e 14.

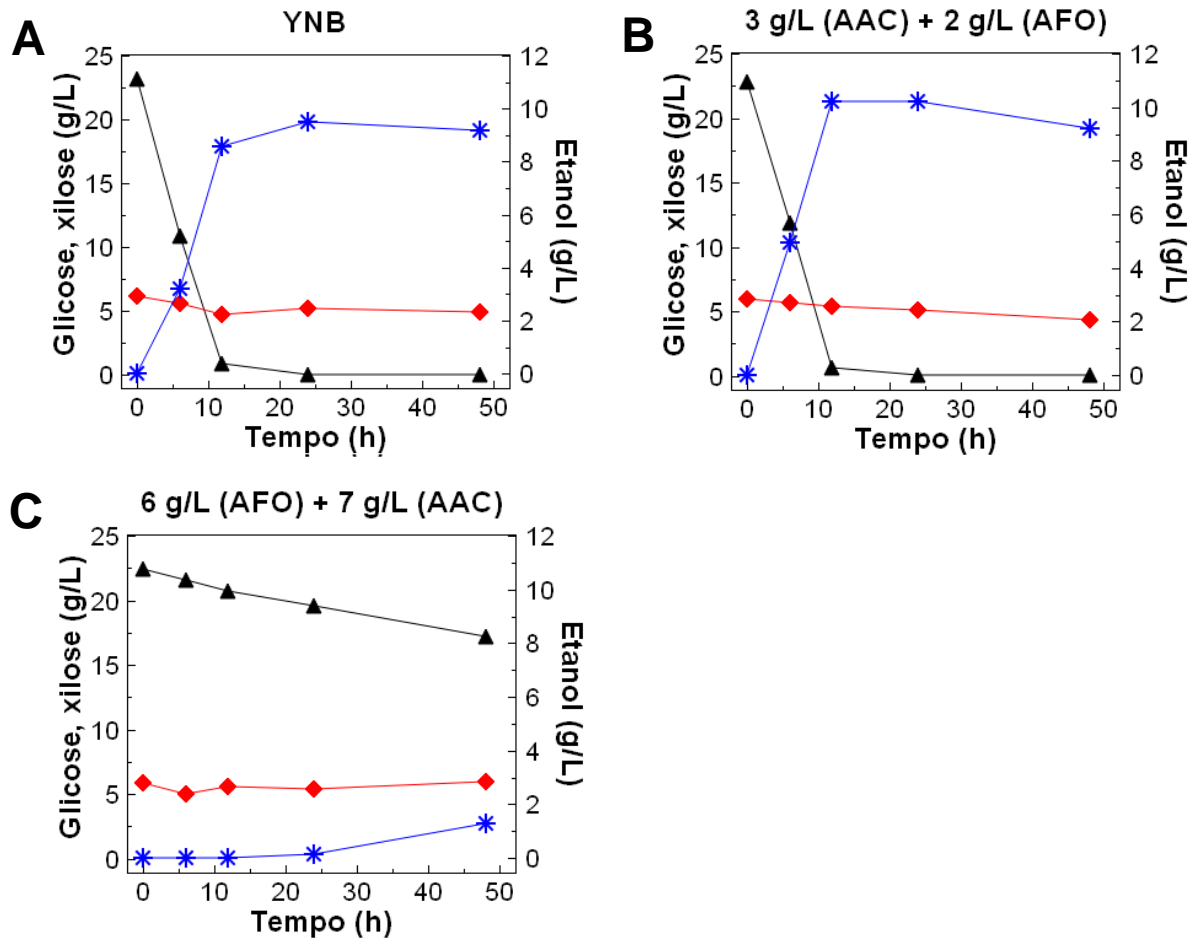


Figura 12 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético e ácido fórmico em associação. (A) controle; (B) 3 g/L de ácido acético e 2g/L de ácido fórmico; (C) 7 g/L de ácido acético e 6 g/L de ácido fórmico. ▲=Glicose; ◆=Xilose; ✱=Etanol.

Nas fermentações com as menores concentrações dos compostos inibitórios em associação, o perfil fermentativo não apresentou alterações significativas nos tempos de consumo dos açúcares e produção de etanol (Figuras 12B, 13B e 14B). A glicose foi consumida nas primeiras 12h e a concentração de xilose residual foi de aproximadamente 4 g/L, semelhantes os experimentos anteriores. As concentrações máximas de etanol encontradas também foram parecidas, demonstrando que os compostos nessa faixa de concentração não exercem efeitos inibitórios na velocidade do consumo de glicose e nem na produção do etanol.

No entanto, o perfil fermentativo da cepa mudou com a adição de 7 g/L (AAC) e 6 g/L (AFO) no mesmo meio, sendo que após as 48 h de cultivo, a concentração residual de glicose foi de ~18 g/L, da xilose ~5 g/L e a produção de etanol máxima encontrada

foi cerca de 1,5 g/L (Figura 12C). Quando a cepa fermenta em meio contendo apenas 7 g/L de ácido acético, nota-se um pequeno atraso no consumo de glicose, mas ela é completamente consumida após 24h. E na fermentação com 6 g/L de ácido fórmico adicionado individualmente, o perfil encontrado é semelhante ao controle.

Os testes realizados utilizando as concentrações de AAC (9 g/L) e de AFO (9 g/L) foram muito tóxicos para o desenvolvimento da G2-104 como visto no teste de crescimento. De acordo com NARAYANAN (et al., 2016), concentrações altas de inóculo podem exercer muitos efeitos benéficos na desintoxicação de um inibidor, incluindo: (I) a heterogeneidade populacional, onde subpopulações ficam mais envolvidas na desintoxicação, facilitando o crescimento de outras subpopulações; e (II) “segurança em números”, ou seja, diminuindo a proporção de concentração do inibidor sobre a concentração celular. Por esse motivo, as mesmas concentrações foram utilizadas com quantidades iniciais de inóculo diferentes. Porém, não houve mudança no resultado.

O ácido acético e o ácido benzóico (estruturalmente semelhante ao ácido 4-hidroxibenzoico) são inibidores bem conhecidos de microrganismos e geralmente são usados como conservantes de alimentos (BROWN; BOOTH, 1991). No entanto, o perfil fermentativo avaliado com a adição de ácido 4-hidroxibenzoico e ácido acético não evidenciou nenhum impacto significativo no perfil fermentativo da cepa (Figura 13).

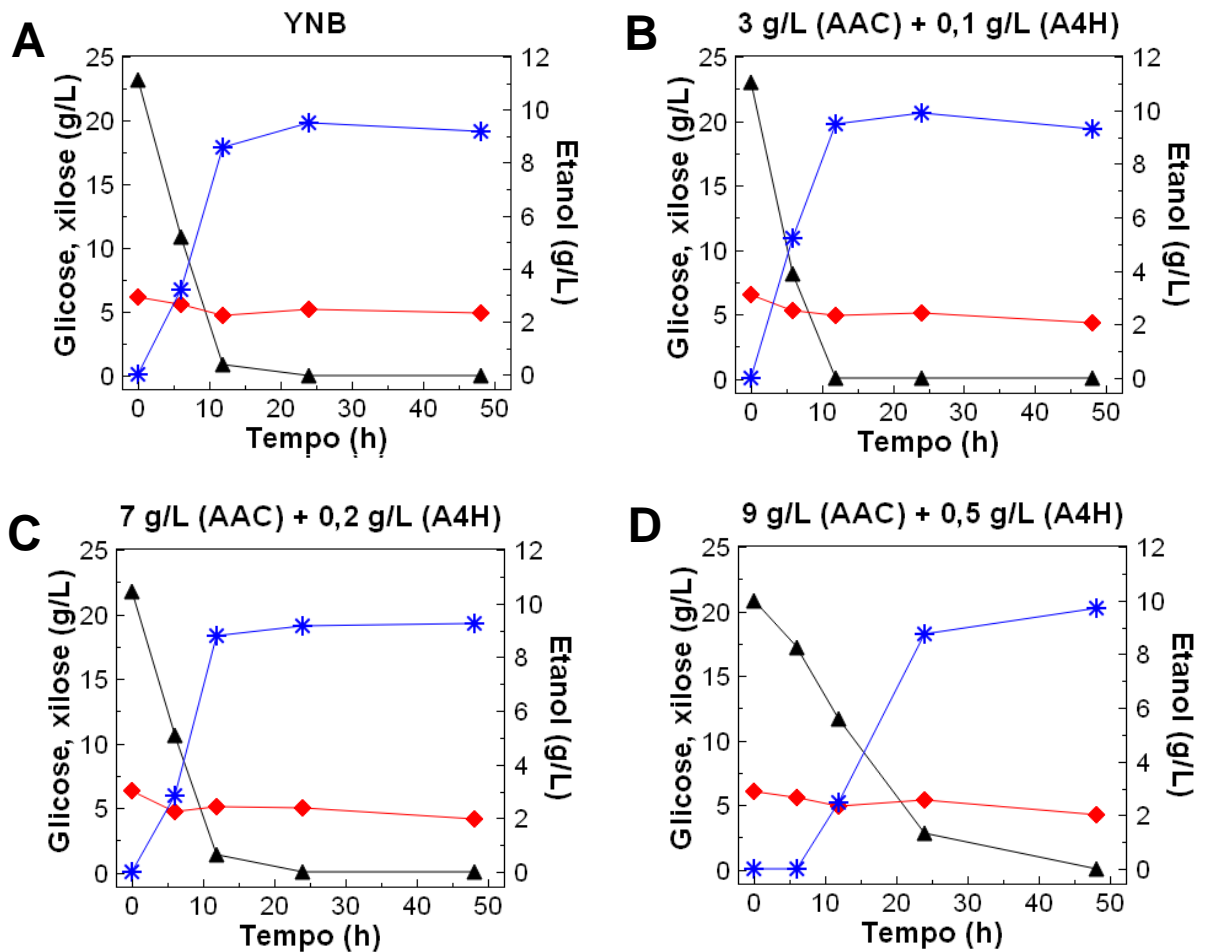


Figura 13 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido acético e ácido 4-hidroxi-benzóico em associação. (A) controle; (B) 3 g/L de ácido acético e 0,1 g/L de ácido 4-hidroxi-benzóico; (C) 7 g/L de ácido acético e 0,2 g/L de ácido 4-hidroxi-benzóico; (D) 9 g/L de ácido acético e 0,5 g/L de ácido 4-hidroxi-benzóico. Símbolos: ▲=Glicose; ◆=Xilose; ✱=Etanol.

Quando se avaliou as fermentações do ácido 4-hidroxi-benzóico com o ácido fórmico (Figura 14), apenas na concentração de 0,5 g/L (A4H) juntamente com 9 g/L (AFO) em meio sintético, que observou-se diferenças no perfil fermentativo da levedura. Nos testes com inibidores individuais, na concentração de 9 g/L (AFO), a quantidade de glicose residual ao fim da fermentação é de ~ 10 g/L. Já no perfil fermentativo da cepa em meio de cultivo com 9 g/L (AFO) e 0,5 g/L (A4H), a glicose foi completamente consumida ao fim do experimento (Figura 14D). No experimento realizado com os inibidores AFO e A4H houve a produção do dobro de etanol quando comparado com o teste apenas com o AFO, demonstrando que o A4H ou a associação dele com AFO foi responsável por melhorar a resistência da cepa aos inibidores e aumentar o rendimento etanólico da fermentação.

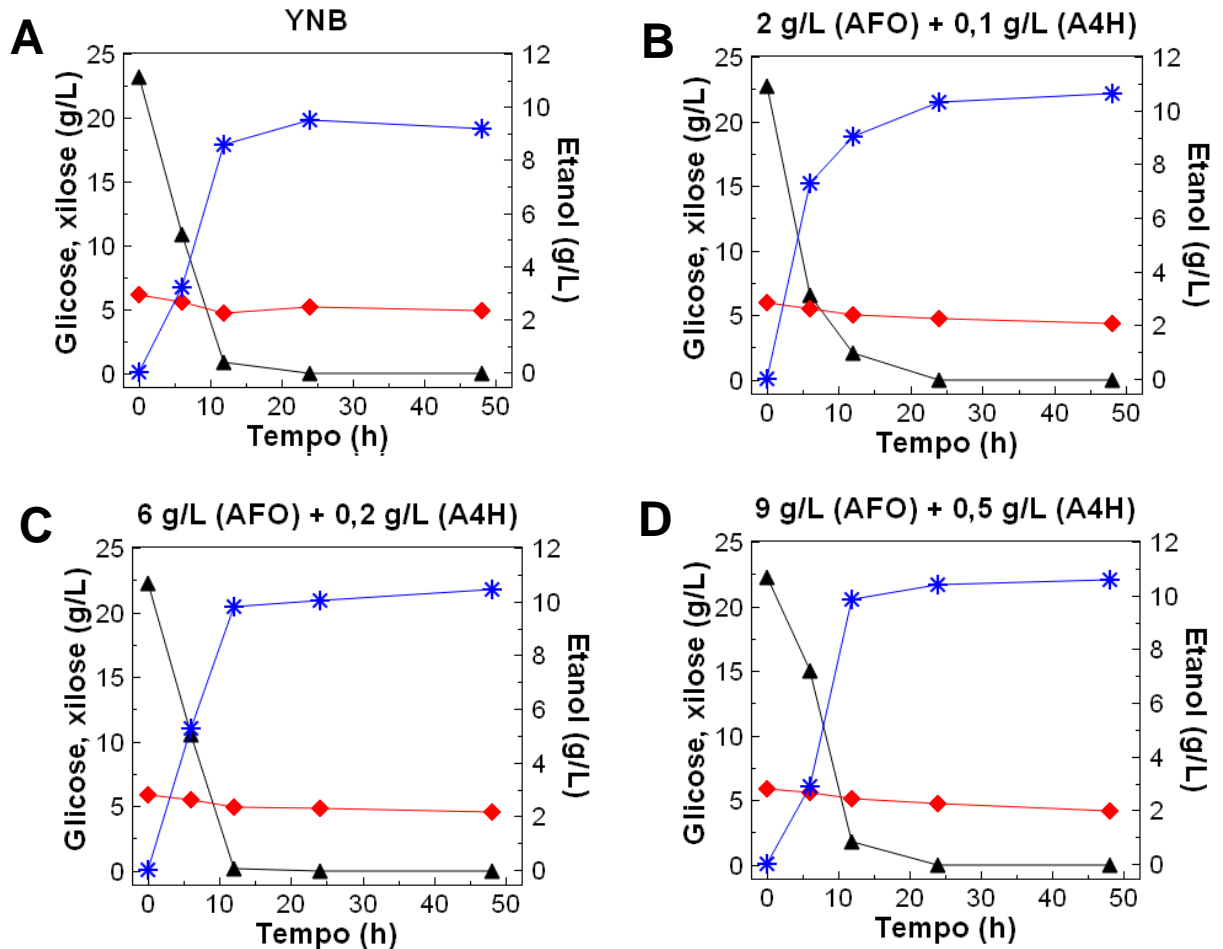


Figura 14 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético com diferentes concentrações de ácido fórmico e ácido 4-hidroxibenzoico em associação. (A) controle; (B) 2 g/L de ácido fórmico e 0,1 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico; (C) 6g/L de ácido fórmico e 0,2 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico; (D) 9g/L de ácido fórmico e 0,5 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico. Símbolos: ▲=Glicose; ◆=Xilose; * =Etanol.

Os perfis fermentativos realizados mostraram que o desempenho da G2-104 se altera dependendo das condições do meio, com a velocidade de consumo de açúcares e produções máximas de etanol variando nos tempos amostrados. Considerando que após o pico máximo da concentração de etanol produzido pela levedura, ela passa a consumi-lo, torna-se indispensável o conhecimento desse tipo de perfil para obtenção de um processo fermentativo com alto desempenho.

Em todos os experimentos de fermentação realizados, o consumo de xilose foi muito baixo. Sabendo que a repressão à glicose do metabolismo das leveduras é uma barreira significativa para a utilização eficiente dos açúcares mistos encontrados nos

hidrolisados celulósicos (HA et al., 2011), realizou-se um ensaio fermentativo da cepa em meio sintético suplementado apenas com xilose (30 g/L) (Figura 15).

Curiosamente, durante as 48h do ensaio de fermentação com as mesmas condições dos outros testes descritos, não se detectou produção de etanol nas amostras coletadas. O consumo desse açúcar também foi baixo, restando uma média de 23 g/L de xilose ao fim do experimento. Demonstrando que a cepa não consegue se desenvolver bem com pentoses, mesmo na ausência de glicose.

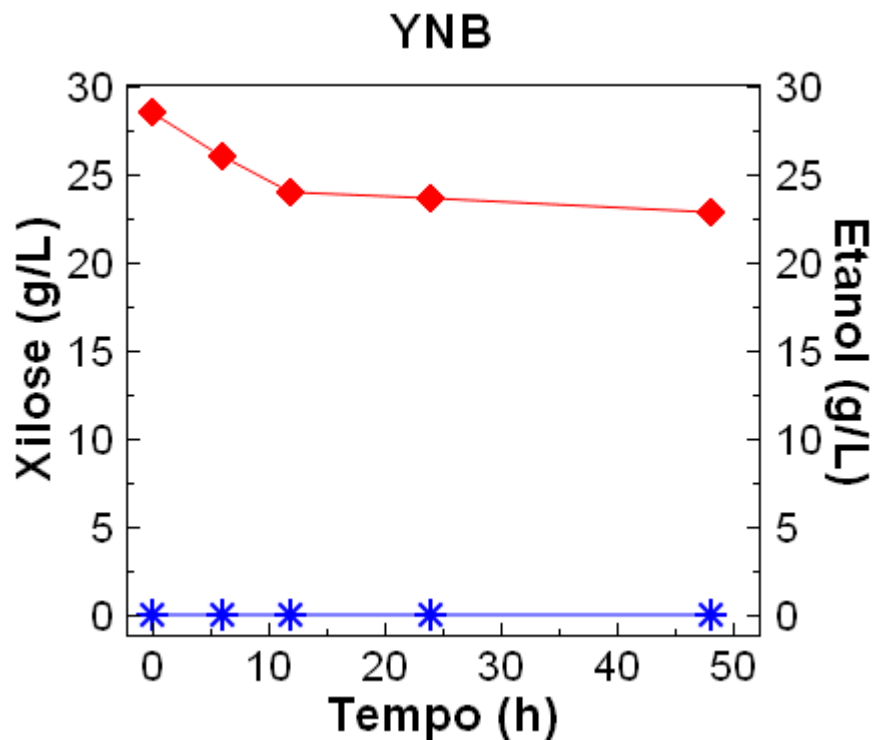


Figura 15 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 em meio sintético suplementado com xilose. ♦=Xilose; * =Etanol.

Em hidrolisados lignocelulósicos um misto de açúcares e outros compostos são encontrados no meio, principalmente glicose e xilose. Devido às etapas adicionais na produção do etanol de segunda geração, para atingir a viabilidade econômica do processo é primordial a utilização de um microrganismo que consiga fermentar pentoses e hexoses. No presente trabalho, a cepa G2-104 demonstrou tolerância aos inibidores adicionados no perfil fermentativo, porém não conseguiu utilizar eficientemente as pentoses do meio.

5.3 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DOS INIBIDORES NO RENDIMENTO DE ETANOL

Após a avaliação do perfil fermentativo, com o objetivo de observar a quantidade de açúcares consumidos que foram efetivamente convertidos em etanol e a velocidade dessa produção, cálculos do rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) e da produtividade volumétrica do etanol (Q_P) foram realizados (Tabela 2). O pH das culturas também foi mensurado.

Todos os experimentos tiveram o pH inicial ajustado para 5,0, que é o valor considerado ideal para o crescimento e fermentação de *S. cerevisiae*. Além disso, essa faixa de pH é mesma utilizada para hidrólise enzimática e fermentação dos hidrolisados do mesocarpo da casca de coco verde (SOARES et al., 2016, 2017).

Apesar dos outros experimentos com inibidores demonstrarem diferenças no crescimento e perfil fermentativo, os rendimentos de etanol não foram afetados negativamente. A cepa G2-104 possui alta capacidade fermentativa e seus rendimentos de etanol ficaram em torno de 90% do rendimento teórico. Na maioria dos tratamentos, as médias dos rendimentos foram maiores que a do controle, mas não apresentaram diferenças significativas.

Essa resposta frente aos inibidores pode ser explicada pela característica que os compostos avaliados têm de entrar nas células das leveduras e acidificarem o pH citosólico, resultando no aumento da demanda energética do organismo para o bombeamento dos solutos para o meio externo. Para suprir essa demanda de ATP, em condições anaeróbicas, as células investem uma maior proporção do açúcar para converter em etanol em vez de destiná-las ao crescimento celular (HELLE et al., 2003).

Tabela 2 - Rendimento e produtividade volumétrica do etanol na fermentação da cepa G2-104 em meio sintético com e sem a adição de inibidores. Os valores de pH demonstrados são referentes ao meio fermentativo ao fim de 48 horas.

Exp.	Inibidores			Respostas		
	AAC (g/L)	AFO (g/L)	AH4 (mg/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	Q_p ($g_{EtOH} L^{-1} h^{-1}$)	pH final
A	0	0	0	0,41 ± 0,03	0,71 ± 0,16	2,5
B	0	0	100	0,39 ± 0,04	0,75 ± 0,07	2,5
C	0	0	200	0,41 ± 0,04	0,78 ± 0,04	2,5
D	0	0	500	0,41 ± 0,02	0,75 ± 0,05	2,6
E	0	2	0	0,45 ± 0,03	0,86 ± 0,04	4,9
F	0	6	0	0,47 ± 0,03	0,85 ± 0,02	5,2
G	0	9	0	0,44 ± 0,03	0,09 ± 0,03	4,8
H	3	0	0	0,44 ± 0,03	0,82 ± 0,04	4,2
I	7	0	0	0,44 ± 0,01	0,61 ± 0,36	4,6
J	9	0	0	0,44 ± 0,01	0,39 ± 0,37	4,7
K	0	2	100	0,45 ± 0,01	0,75 ± 0,18	4,8
L	0	6	200	0,45 ± 0,02	0,82 ± 0,08	4,9
M	0	9	500	0,47 ± 0,03	0,82 ± 0,17	5,3
N	3	0	100	0,41 ± 0,02	0,79 ± 0,05	4,4
O	7	0	200	0,39 ± 0,04	0,73 ± 0,10	4,3
P	9	0	500	0,40 ± 0,04	0,21 ± 0,09	4,7
Q	3	2	0	0,45 ± 0,02	0,85 ± 0,03	5
R	7	6	0	0,06 ± 0,01	0	5
S	9	9	0	0	0	4,9

A produtividade volumétrica de etanol da cepa G2-104 foi expressivamente menor nos experimentos G (0,09 g/L/h) e P (0,21 g/L/h) da Tabela 2, que correspondem respectivamente, às fermentações realizadas com 9 g/L de ácido fórmico adicionado individualmente e às fermentações em meio sintético com a adição de 9 g/L de ácido acético juntamente com 0,5 g/L de ácido 4-hidroxibenzóico.

Os experimentos R e S (Tabela 2) foram inviáveis para o desenvolvimento da cepa. Geralmente, baixas concentrações de ácidos estimulam a produção de etanol, mas em níveis mais altos, a demanda de ATP pode ser tão alta que os microrganismos não conseguem evitar a acidificação do citosol.

O pH final das fermentações em meio sintético do controle e com a adição de A4H foram diferentes de todos os outros ensaios. Ao fim de 48h, o pH se encontrava em torno de 2,5, enquanto dos ensaios com a presença de ácidos fracos estavam com o pH ~ 5. De acordo com PALMQVIST (et al., 1999) quando o pH diminui para abaixo de 2,7 nas fermentações, o crescimento celular cessa. Em contrapartida, nos experimentos de crescimento do presente estudo, as maiores taxas de crescimento foram alcançadas pelos controles e nos meios que foram adicionados o AH4.

5.4 PERFIL FERMENTATIVO DE *S. cerevisiae* NO HIDROLISADO DA CASCA DE COCO VERDE

Para caracterizar o perfil fermentativo da G2-104 nos hidrolisados do mesocarpo da casca de coco verde (HMC), fermentações foram conduzidas em frascos de vidro (50 mL) nas mesmas condições descritas nos experimentos feitos com meio sintético. O desempenho da cepa foi avaliado no HMC com e sem adição dos compostos inibitórios. Utilizou-se uma concentração de cada inibidor nesse ensaio, com o objetivo de investigar se os compostos exerceriam efeitos diferentes na fermentação quando encontrados em maior quantidade nos hidrolisados. As concentrações utilizadas foram de 7 g/L de ácido acético, 6 g/L de ácido fórmico e 0,2 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico, que foram acrescentados separadamente em diferentes frascos contendo o HMC, que já possui inibidores, como citado anteriormente no presente trabalho (Figura 16).

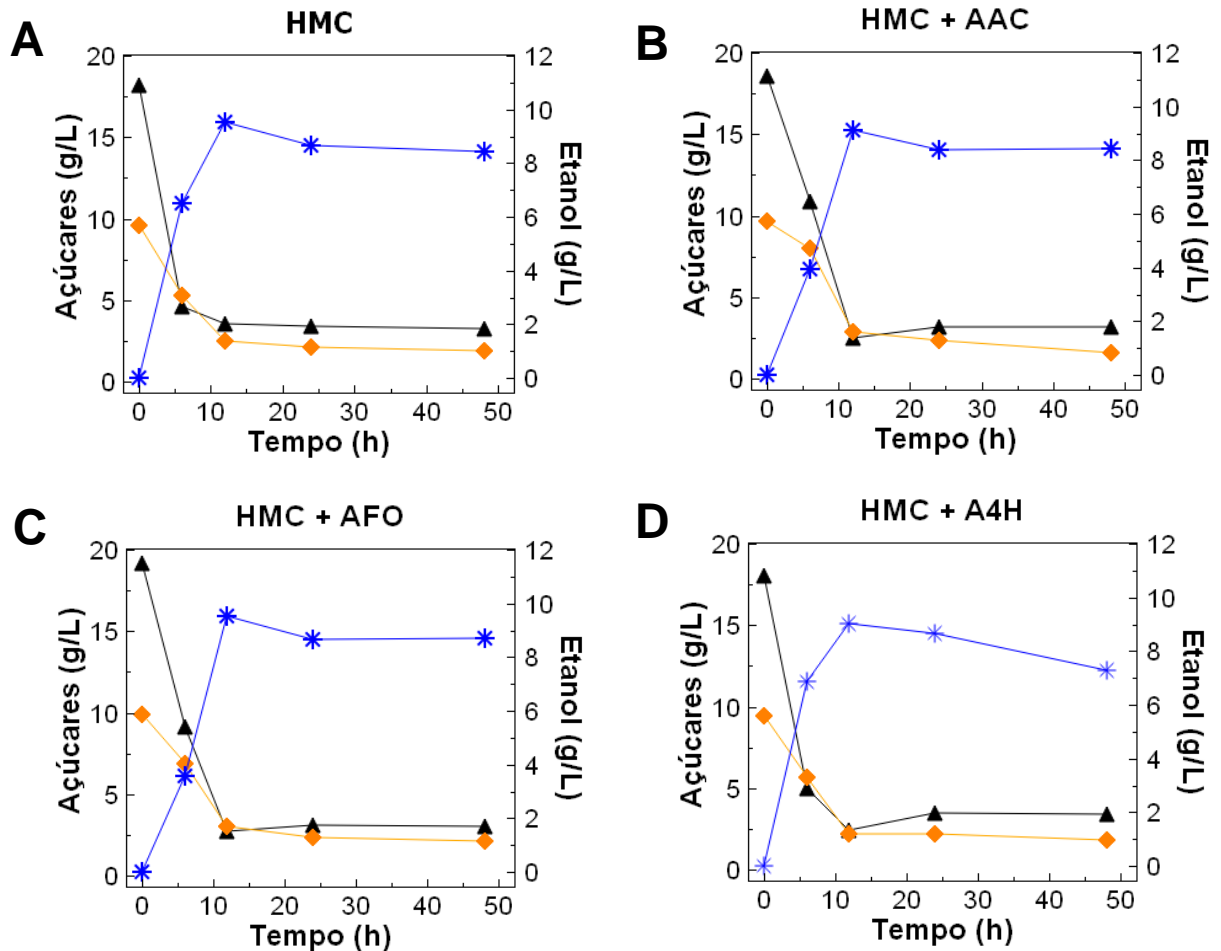


Figura 16 - Perfil fermentativo da cepa G2-104 no hidrolisado alcalino do mesocarpo do coco verde com adição de inibidores. (A) Controle; (B) adição de 7 g/L de ácido acético; (C) adição de 6g/L de ácido fórmico; (D) adição de 200 mg/L de ácido 4-hidroxibenzóico. Símbolos: ▲=Glicose; ◆=Xilose; * =Etanol.

Os perfis fermentativos da cepa nos hidrolisados da casca de coco foram semelhantes em todos os testes. A cepa alcançou a concentração máxima do etanol com 12h e em todos os ensaios a média de açúcares residuais foi de 3,21 (\pm 0,41) g/L de glicose e 1,81 (\pm 0,17) g/L de manose/xilose. Os açúcares de xilose (pentose) e manose (hexose) não são identificados separadamente pelas análises cromatográficas realizadas neste estudo, ambos possuem o mesmo tempo de retenção. Pelo fato da cepa não ter consumido xilose eficientemente em nenhum dos outros experimentos de fermentação, presume-se que a maior parte desta fração de açúcares dos hidrolisados alcalinos da casca de coco seja composta por manose.

Em hidrolisados com concentrações de açúcares suficientemente altas para produção economicamente viável de bioetanol pode haver de 7 a 11 g/L de ácido acético

(CASEY et al., 2010). Neste ensaio, além das quantidades de inibidores já presentes no meio, adicionou-se mais 7 g/L de ácido acético e, mesmo assim, não houve mudança aparente no perfil fermentativo cepa, o que indica que esta é uma cepa robusta e possui características desejáveis para indústria.

Para finalizar a caracterização da cepa aos principais inibidores encontrados nos hidrolisados de casca de coco, o seu rendimento e a produtividade volumétrica de etanol também foram calculados (Tabela 3). Como esperado, os rendimentos tiveram valores menores quando comparados aos valores encontrados no meio sintético. Mas por se tratar de um meio com uma alta concentração de diversos compostos, a cepa G2-104 demonstrou um bom desempenho, atingindo cerca de 80 % dos rendimentos teóricos do etanol.

Tabela 3 - Rendimento e produtividade volumétrica do etanol na fermentação da cepa G2-104 no hidrolisado do mesocarpo da casca de coco verde com e sem a adição de inibidores. Os valores de pH demonstrados são referentes ao meio fermentativo ao fim de 48 horas.

EXPERIMENTOS	$Y_{p/s}$ (g etanol/g açúcar)	Q_p (g _{EtOH} L ⁻¹ h ⁻¹)	pH final
HMC	0,38 ± 0,01	0,79	5,2
HMC + 7 g/L (AAC)	0,36 ± 0,01	0,76 ± 0,03	5,1
HMC + 6 g/L (AFO)	0,37 ± 0,05	0,79 ± 0,02	6,2
HMC + 200 mg/L (A4H)	0,36 ± 0,02	0,75 ± 0,02	5,1

Os dados apresentados nesta tabela não possuem diferenças significativas relacionadas aos rendimentos, apenas no pH ao final das fermentações. A faixa ideal de pH para o desenvolvimento de *S. cerevisiae* é de 5,0 a 5,5 (VERDUYN et al., 1992), no entanto ela consegue sobreviver em uma ampla faixa de pH. O pH mais próximo de 7,0 se torna mais estressante para a levedura do que na faixa de 3,0, devido as suas adaptações evolutivas para crescer em ambientes mais ácidos (BHARATULA; BROACH, 2018). No entanto, mesmo com o pH final em 6,2 os rendimentos e produtividade da cepa G2-104 não foram afetados.

6. CONCLUSÕES

Os ácidos fracos, como o ácido acético e o ácido fórmico, inibem o crescimento da cepa G2-104. Apesar disso, as concentrações desses compostos que não inviabilizam o seu desenvolvimento, não exercem efeitos prejudiciais aos títulos e rendimento de etanol produzido, alterando apenas o perfil fermentativo. O ácido 4-hidroxibenzoico não exerceu nenhum efeito inibitório dentro dos testes realizados, demonstrando que suas concentrações relatadas em hidrolisados do mesocarpo do coco não prejudicam o desempenho de *S. cerevisiae*. Além disso, demonstrou ser benéfico para a levedura quando adicionado em meio sintético com o ácido fórmico, melhorando o seu desempenho na fermentação. Os resultados mostraram a cepa G2-104 possui um bom desempenho nos hidrolisados por ser tolerante aos principais inibidores deste meio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2014.

ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, 2007.

ANKU, W. W.; MAMO, M. A.; GOVENDER, P. P. Phenolic compounds in water: sources, reactivity, toxicity and treatment methods. **Phenolic compounds-natural sources. Importance and Applications, First Ed. InTech**, p. 419–443, 2017.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.003>>.

BENKERT, O. Pocket Guide. **Pocket Guide**, 2013.

BHARATULA, V.; BROACH, J. R. **The Nutrient Stress Response in Yeast**. [S.l.: s.n.], 2018.

BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKEY, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 5, p. 705–719, 2010.

BLUM, U.; SHAFER, S. R.; LEHMAN, M. E. Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. an experimental model. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 673–693, 1999.

BOLIVAR-TELLERIA, M., TURBAY, C., FAVARATO, L., CARNEIRO, T., de BIASI, R. S., FERNANDES, A. A. R., SANTOS, A. M. C. e FERNANDES P. M. B. **Second-Generation Bioethanol from Coconut Husk**. **Biomed Research International**. Hindawi, Volume 2018, ID do Artigo 4916497 – 20 páginas. DOI: <<https://doi.org/10.1155/2018/4916497>>. 2018.

BONAWITZ, Nicholas D.; CHAPPLE, Clint. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. **Annual review of genetics**, v. 44, p. 337-363, 2010.

BROWN, M. H.; BOOTH, I. R. Food preservatives. **London: Blackie and Son**, 1991.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. de S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 4, p. 533–535, 2002.

CASEY, E. et al. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 4, p. 385–393, 2010.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 342–346, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiosc.2016.10.007>>.

DAS, Pratyush Kumar; DAS, Bidyut Prava; DASH, Patitapaban. Role of Energy Crops to Meet the Rural Energy Needs: An Overview. In: **Biomass Valorization to Bioenergy**. Springer, Singapore, 2020. p. 11-30.

EMBRAPA. **Tecnologia aproveita casca de coco verde e ajuda a despouirpraias e cidades**. Brasília. 2004.

FAOSTAT. Coconut production in 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>

FELDMANN, H. et al. *Yeast*. Bergkirchen: Wiley-Blackwe. Alemanha. 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; DE GRUYTER, W. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin; New York: W. . [S.I.]: de Gruyter. xiii. , 1989

FERNANDES, P. M. B. *Levedura: do pão à biotecnologia*. Vitória, ES: Edufes, 2009.

FERREIRA, D. et al. Yeast multistress resistance and lag-phase characterisation during wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 6, 10 jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsyr/fox051>>.

Gagliano J, Xiong B (2017) **California fuel cell partnership**. In: Retail hydrogen fueling stationnetwork update, presentation, 24 Oct 2017, p 12.

GARCÍA-APARICIO, M. P. et al. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 129, n. 1–3, p. 278–288, 2006.

GASCH, A. P. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. **Yeast Stress responses**. [S.I.]: Springer, 2003. p. 11–70.

GIANNATTASIO, S. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. FEB, p. 1–7, 2013.

HA, S.-J. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 504–509, 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006.

HELLE, S. et al. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 786–792, 2003a.

HILL, J. et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 30, p. 11206–11210, 2006.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

KASAVI, C. et al. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **biomass and bioenergy**, v. 45, p. 230–238, 2012.

KATIHA, Pradeep K. et al. Inland aquaculture in India: past trend, present status and future prospects. **Aquaculture Economics & Management**, v. 9, n. 1-2, p. 237-264, 2005.

KAVŠČEK, M. et al. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 94, 2015.

KLINKE, H. B. et al. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnology and bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 738–747, 2003.

KO, J. K.; UM, Y.; LEE, S. M. Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 422–430, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.130>>.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, R. P. et al. Biomass Valorization to Bioenergy. n. January, p. 226, 2020.

LARSSON, S. et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. 2000, [S.I.]: Springer, 2000. p. 617–632.

MARTIN, C. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Appl. Biochem. Biotechnol.** [S.I.]: Springer, 2007. p. 339–352.

MARTINS, C. R.; JESUS JR, L. A. Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. **Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros.(Documentos 164). Portuguese**, 2014.

MEDAWAR, W.; STREHAIANO, P.; DÉLIA, M.-L. Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 527–532, 2003.

MONEY, N. P. **The Rise of Yeast: How the Sugar Fungus Shaped Civilization**. [S.I.]: Oxford University Press, 2018.

MOYSÉS, D. N. et al. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–18, 2016.

NARAYANAN, V. et al. Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016.

PALMQVIST, E. et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46–55, 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5–6, p. 547–550, 1989.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 743–762, 2009.

RAES, Jeroen et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.

RANDHIR, R. et al. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 13, n. 3, 2004.

RAUD, M. et al. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 111, n. May, p. 44–56, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.020>>.

RFA (2019) Industry statistics 2017: World fuel ethanol production. <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>. Last visited 1 June 2019

RIVARD, C. J. et al. Measurement of the inhibitory potential and detoxification of biomass pretreatment hydrolysate for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 183, 1996.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174–187, 2018.

ROCHA, M. S. R. dos S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; DA CRUZ, A. J. G. **Avaliação Do Potencial Energético De Resíduos Agroindustriais Provenientes De Diferentes Regiões Brasileiras**. **Engevista**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017.

SAHA, K. et al. Membranes as a tool to support biorefineries: Applications in enzymatic hydrolysis, fermentation and dehydration for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. May 2016, p. 873–890, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.015>>.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>>.

SOARES, J. et al. Fed-batch production of green coconut hydrolysates for high-gravity second-generation bioethanol fermentation with cellulosic yeast. **Bioresource Technology**, v. 244, n. June, p. 234–242, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.140>>.

SOARES, J. et al. Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 744–753, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.105>>.

STAMBUK, B. U. et al. **Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains**. 2008.

SWINNEN, I. A. M. et al. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137–159, 2004.

TABATABAEI, M., et al. Renewable energy and alternative fuel technologies. **BioMed research international**, 2015.

TAHERZADEH, M. J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701–708, 2000.

TREVISOL, Eduardo TV et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 697-704, 2011.

ULBRICHT, R. J.; NORTHUP, S. J.; THOMAS, J. A. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. **Toxicological Sciences**, v. 4, n. 5, p. 843–853, 1984.

VAN BEILEN, J. B. Biofuels, Bioprod. **Bioref**, v. 4, p. 41, 2010.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 391–418, 2006.

VELUSAMY, S.; GUNASEKARAN, P. Bioethanol production from cellulosic substrates: Engineered bacteria and process integration challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, 1 nov. 2005.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 7, p. 501–517, 1992.

VON SIVERS, M. et al. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology progress**, v. 10, n. 5, p. 555–560, 1994.

WALKER, G. M.; WALKER, R. S. K. **Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations**. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2018. v. 105. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003/>>.

WHETTEN, R. W., MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R., STREET, N. W. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 49, p. 585–609, 1998.