

JULIANA MARIA SAMPAIO FURLANI

Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva

Edição reimpressa e corrigida

LORENA – SP

Setembro, 2014

RESUMO

FURLANI, J. M. S. **Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão.** 2014. 162p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2014.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência de 8 compostos fenólicos de baixa massa molar, oriundos da degradação da lignina, sobre a fermentação de glicose a etanol, em meio semidefinido, utilizando-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e de panificação. Esses compostos são formados quando o bagaço de cana-de-açúcar é pré-tratado, por explosão a vapor. Assim, *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cumárico e ácido ferúlico foram adicionados individualmente aos meios de fermentação. Objetivou-se, também, identificar e quantificar os produtos da bioconversão desses compostos pela *S. cerevisiae* PE-2, por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas. Os resultados mostraram que o *p*-hidroxibenzaldeído e o ácido *p*-hidroxibenzoico não foram tóxicos para ambas as cepas. Para a cepa PE-2, o siringaldeído e os ácidos cumárico e ferúlico também não apresentaram toxicidade. No caso da *S. cerevisiae* de panificação, a vanilina, o siringaldeído e o ácido vanílico ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) dificultaram o consumo de glicose, diminuíram a produtividade volumétrica (Q_p) e aumentaram o desvio de glicose para ácido acético. Vanilina ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) aumentou o fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/S}$). Os ácidos siríngico e ferúlico ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e o ácido cumárico ($0,6$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) diminuíram $Y_{X/S}$ (~50%), aumentaram o desvio de glicose para glicerol, dificultaram o consumo de glicose e diminuíram Q_p , tendo os ácidos cumárico e ferúlico apresentado o maior efeito inibitório. Para a *S. cerevisiae* PE-2, a presença da vanilina provocou a queda de Q_p , devido à dificuldade inicial em consumir o substrato. Já os ácidos vanílico e siríngico foram bastante inibitórios, dificultando o consumo da glicose, diminuindo Q_p e aumentando os desvios de glicose para a produção de glicerol e ácido acético. Os ácidos cumárico e ferúlico aumentaram o $Y_{X/S}$ (~45 e 80%). Quanto à bioconversão dos compostos fenólicos pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, apenas os ácidos que apresentam carboxila benzílica (ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanílico e siríngico) não foram transformados. A cepa PE-2 transformou rapidamente os aldeídos, formando os respectivos ácidos e alcoóis (esses últimos, provavelmente, formados em maior extensão). Esta levedura também foi capaz de converter os ácidos cumárico e ferúlico, mas neste trabalho não foram identificados os produtos dessa transformação. Concluiu-se que os compostos afetaram mais a Q_p do que $Y_{X/S}$. O fator de conversão de glicose em etanol não foi afetado por nenhum dos compostos. Alguns provocaram um maior desvio de glicose para a formação de glicerol. O desvio de glicose para ácido acético, nos meios aos quais se adicionou os aldeídos, acompanhou a bioconversão dos mesmos em seu produto de redução, preferencialmente. Este trabalho confirmou os dados da literatura de que a inibição dos processos fermentativos não depende apenas da natureza do composto, mas também de sua concentração e do tipo de micro-organismo.

Palavras-chave: inibidores químicos, compostos fenólicos, fermentação, *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

ABSTRACT

FURLANI, J. M. S. **Influence of phenolic compounds in the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 and baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of its bioconversion products.** 2014. 162p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2014.

The main objective of the present work was to investigate the influence of eight low molecular weight phenolic compounds, obtained from lignin degradation, in the fermentation of glucose to ethanol using *S. cerevisiae* PE-2 and the baker's yeast *S. cerevisiae* in a semi-defined medium. These compounds are originated from the pretreated sugarcane bagasse by steam explosion. Thus, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, coumaric acid and ferulic acid were added separately in the fermentative media. Moreover, the bioconversion products of these molecules by *S. cerevisiae* were identified and quantified by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. These results indicated that 4-hydroxybenzaldehyde and 4-hydroxybenzoic acid were not toxic for both strain. Additionally, syringaldehyde and coumaric and ferulic acids were also not toxic for PE-2 strain. Vanillin, syringaldehyde and vanillic acid (at 1.0g.L^{-1}) made the glucose consumption slower, reduced the volumetric productivity (Q_p), increased the deviation of glucose to produce acetic acid for the baker's yeast *S. cerevisiae* system. Vanillin (at 1.0g.L^{-1}) increased the cellular mass yield. Syringic and ferulic acids (at 1.0g.L^{-1}) and coumaric acid (at 0.6 and 1.0g.L^{-1}) highly inhibited the microbial growth (about 50 %), increased the deviation of glucose to produce the glycerol and made slower the glucose consumption, reducing Q_p . Coumaric and ferulic acids were the greatest inhibitors compounds for the baker's yeast *S. cerevisiae*. For *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, the presence of vanillin led to a Q_p reduction, based on the initial difficult in substrate consumption. Vanillic and syringic acids were extremely inhibitory, making difficult the glucose consumption, reducing Q_p and increasing both, glycerol and acetic acid production by deviation of glucose. Coumaric and ferulic acids increased the cellular yield (about 48 and 80 %). Concerning the bioconversion of the phenolic acids by *S. cerevisiae* PE-2, only those molecules presenting the benzilic carboxyl group (4-hydroxybenzoic, vanillic and syringic acids) did not reacted. In contrast, aldehydes were rapidly transformed into their respective acids and alcohols (being this last one probably formed in greater amount). *S. cerevisiae* PE-2 was also capable to convert coumaric and ferulic acids, however, herein none products were identified. Thus, the compounds most affect ethanol productivity than the cellular mass yield. The ethanol yield was not affected by any of the compounds. Some of them led to a greater glucose deviation to produce glycerol and acetic acid. This work confirmed previously data published in the literature indicating that the inhibition of fermentative process did not depend exclusively on the compounds, but also its concentration and microorganism type.

Keywords: chemical inhibitors, phenolic compounds, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.