

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras  
isoladas da biodiversidade latino-americana**

Giulia Bettio

Porto Alegre

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras  
isoladas da biodiversidade latino-americana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Prof. Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre

2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Bettio, Giulia

Avaliação da bioconversão de ácido ferúlico em aromas vaniloides por leveduras isoladas da biodiversidade latino-americana / Giulia Bettio. -- 2020.

97 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Bioprocesso. 2. Leveduras. 3. Aromas. I. Ayub, Marco Antônio Záchia, orient. II. Título.

Giulia Bettio

**DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Aprovada em: ...../...../.....

Homologada em: ...../...../.....

Pela Comissão Examinadora:

Por:

Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub

Orientador – UFRGS

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Coordenador do Programa de Pós Graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
(PPGCTA)

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Docente – UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Hickmann Flores

Diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos - ICTA/UFRGS

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lilian Raquel Hickert

Docente – UFRGS

Prof. Dr. Juliano Garavaglia

Docente – UFCSPA

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e aos vários professores do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para minha formação como mestre durante estes dois anos.

À CAPES, ao CNPQ e à FAPERGS, pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador, Marco Antônio Záchia Ayub, nosso querido Boss, por todos os ensinamentos, atenção e por todos os conselhos, pessoais e profissionais, que com certeza contribuíram para o desenvolvimento de uma Nika mais madura.

À minha mãe, Alessandra, que mesmo com a distância não poupou amor e carinho durante esta etapa, fruto de um apoio incondicional à minha educação.

À minha bolsista de iniciação científica Luíza, que topou embarcar nesse projeto comigo e me ajudou não só a conduzir esse trabalho como transformou meus dias em momentos de mais alegria e descontração no laboratório.

Aos colegas do BiotecLab pela parceria e pelos inúmeros momentos de risada. Agradeço especialmente à Laura, meu anjinho da guarda na terra, pela amizade, pelas risadas e pelos conselhos nos momentos de completo desespero. À “mãe” Carla, por todos os conhecimentos compartilhados, por todo o carinho e amizade, e pelas cervejas e café pós expediente.

Aos membros da banca, professores Juliano Garavaglia, Lilian Hickert e Plinho Francisco Hertz, por aceitarem participar da discussão e correção deste trabalho.

Ao Leandro, meu grande amor e porto seguro, por todo o carinho, compreensão e apoio. Por entender minha ausência e por segurar as pontas junto comigo, nesse turbilhão de coisas que vivemos, cada vez mais juntos. Te amo!

## RESUMO

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo principal de produzir aditivos alimentícios por via biotecnológica, através da utilização de microrganismos. Aromas produzidos biotecnologicamente, além de serem legalmente classificados como naturais, apresentam diversas vantagens quando comparados aos métodos tradicionais como maior pureza óptica, melhores características sensoriais e a possibilidade de serem produzidos continuamente. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a obtenção biotecnológica de aromas vaniloides como ácido vanílico, vanilina e 4-vinilguaiacol por linhagens de diferentes gêneros de levedura a partir de ácido ferúlico em meio sintético. Oito das nove linhagens testadas (88 %) apresentaram capacidade de assimilação de ácido ferúlico, entretanto, somente 3 foram capazes de converter o substrato em compostos de aroma. As linhagens selecionadas de *Rhodotorula mucilaginosa* (UFMG-CM-Y3647, UFMG-CM-Y2190, UFMG-CM-Y665) foram avaliadas em experimentos em frascos para investigar a influência do pH inicial e um cultivo em dois estágios foi conduzido visando a máxima obtenção de ácido vanílico, vanilina e 4-vinilguaiacol. O pH foi observado como parâmetro significativo ( $p < 0,05$ ) na bioconversão de ácido ferúlico, em que condições de  $pH < 6,0$  favoreceram a produção de ácido vanílico, com máxima concentração de  $1,14 \pm 0,02$  e  $1,25 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$  para as linhagens UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-Y2190, respectivamente. O cultivo em dois estágios favoreceu a produção de 4-vinilguaiacol para a maioria das linhagens, sendo a linhagem UFMG-CM-Y2190 a melhor produtora, com acúmulo de  $1,63 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$  após 55 h, resultando em uma produtividade volumétrica de  $29,59 \pm 1,55 \text{ mg.}(L \cdot h)^{-1}$ . O aumento na concentração de glicose não demonstrou efeito positivo na produção de ácido vanílico, mas foi possível observar sua influência na modulação do metabolismo das linhagens. A linhagem *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 foi selecionada para experimentos em biorreator, em que foram avaliadas condições de pH controlado (5,5 e 6,5) e diferentes aerações foram testadas, com o objetivo de aumentar a produção e os parâmetros cinéticos de ácido vanílico. A condição de pH controlado em 5,5 e aeração de 2,5 vvm foi definida como a melhor para obtenção da máxima produtividade do metabólito, em que foi observada a produção de  $1,20 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ , com rendimento molar de 78 % e produtividade calculada de  $40,82 \pm 0,57 \text{ mg.}(L \cdot h)^{-1}$ . Em seguida, as linhagens UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-Y2190 foram cultivadas hidrolisado ácido de casca de arroz e casca de aveia, com o objetivo de produzir ácido vanílico e vanilina em resíduos agroindustriais. Ambas leveduras apresentaram boa adaptação ao hidrolisado, indicando seu potencial de uso. A levedura UFMG-CM-Y3647 apresentou melhores resultados com relação à degradação de compostos fenólicos, especificamente ácido ferúlico, variando entre 20 % no hidrolisado de casca de arroz e 68 % no hidrolisado de casca de aveia. Embora os resultados de produtividade não tenham apresentado diferenças significativas, observou-se que a máxima produção de ácido vanílico pela levedura *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647, de  $7,43 \pm 1,57 \text{ mg.L}^{-1}$  no hidrolisado de casca de arroz e  $11,75 \pm 1,68 \text{ g.L}^{-1}$  para o hidrolisado de cascas de aveia, foi obtida após 24 h de cultivo, resultando em uma produtividade de  $0,31 \pm 0,07 \text{ mg.}(L \cdot h)^{-1}$  e  $0,49 \pm 0,07 \text{ mg.}(L \cdot h)^{-1}$ , respectivamente. Este é o primeiro trabalho avaliando o potencial de utilização de linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa* em hidrolisados de casca de arroz e casca de aveia visando a produção de compostos de aroma.

**Palavras chave:** bioconversão; ácido ferúlico; ácido vanílico; 4-vinilguaiacol; vanilina; *Rhodotorula mucilaginosa*; resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

Several studies have been conducted aiming the production of food additives by biotechnological route, through the use of microorganisms. Aromas produced biotechnologically, besides being legally classified as 'natural', have several advantages when compared to traditional methods such as higher optical purity, better sensory characteristics and the possibility of being produced continuously. Within this context, this work aimed to evaluate the biotechnological production of vanilloid aromas such as vanillic acid, vanillin and 4-vinylguaiacol by different yeast strains from ferulic acid in a synthetic medium. Eight of the nine strains tested (88%) showed the ability to assimilate ferulic acid, however, only 3 were able to convert the substrate into aroma compounds. Selected strains of *Rhodotorula mucilaginosa* (UFMG-CM-Y3647, UFMG-CM-Y2190, UFMG-CM-Y665) were evaluated in flask experiments to investigate the influence of initial pH and a two-step process was carried out aiming to maximize vanillic acid, vanillin and 4-vinylguaiacol production. The pH was found to be significantly important ( $p < 0.05$ ) for ferulic acid bioconversion, in which conditions of  $pH < 6.0$  favored the production of vanillic acid, with maximum concentration of  $1.14 \pm 0.02$  and  $1.25 \pm 0.03$  g.L<sup>-1</sup> for UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y2190, respectively. Two-step process favored the production of 4-vinylguaiacol for most strains, with UFMG-CM-Y2190 being the best producer, with accumulation of  $1.63 \pm 0.09$  g.L<sup>-1</sup> after 55 h, resulting in a volumetric productivity ( $Q_{VG}$ ) of  $29.59 \pm 1.55$  mg. (L·h)<sup>-1</sup>. The increase in glucose concentration did not show a positive effect on vanillic acid production, but it was possible to observe its influence on the metabolism modulation of strains. *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 was selected for experiments in a 2-L bioreactor, in which conditions of controlled pH (5.5 and 6.5) were evaluated and different aerations were tested, aiming to maximize vanillic acid production and its kinetic parameters. pH-controlled at 5.5 and aeration of 2.5 vvm was defined as the best condition to obtain maximum metabolite productivity, whereas the production of  $1.20 \pm 0.02$  g.L<sup>-1</sup> was observed after 30 h, with a molar yield 78% and calculated productivity of  $40.82 \pm 0.57$  mg.(L·h)<sup>-1</sup>. Furthermore, the strains UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y2190 were grown in an acid hydrolyzed medium of oat husk and rice husk, aiming to produce vanillic acid and vanillin from agro-industrial residues. Both yeasts showed good adaptation to hydrolysate, indicating its use potential. UFMG-CM-Y3647 showed better results upon degradation of phenolic compounds, specifically ferulic acid, varying between 20% in rice husk hydrolysate and 68% in oat husk hydrolysate. Although productivity results have not shown significant differences, we noticed that maximum production of vanillic acid by *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647,  $7.43 \pm 1.57$  mg.L<sup>-1</sup> in rice husk hydrolysate and  $11.75 \pm 1.68$  mg.L<sup>-1</sup> in oat husk hydrolysate, were achieved after 24 h of culture, resulting in a productivity of  $0.31 \pm 0.07$  mg.(L·h)<sup>-1</sup> and  $0.49 \pm 0.07$  mg.(L·h)<sup>-1</sup>, respectively. This is the first work evaluating the potential of *Rhodotorula mucilaginosa* strains in rice husks and oat husks hydrolysate to produce aroma compounds.

**Keywords:** bioconversion; ferulic acid; vanillic acid; 4-vinylguaiacol; vanillin; *Rhodotorula mucilaginosa*; agro-industrial wastes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

Figura 1. Estruturas químicas de compostos que apresentam grupo vaniloide (estrutura em vermelho).....	20
Figura 2. Esquema das reações envolvidas na síntese de lignina em plantas.....	23
Figura 3. Estrutura do ácido ferúlico esterificado a unidades de arabinose de arabinosilana. ....	24
Figura 4. Rotas de degradação do ácido ferúlico. A – Rota independente de coenzima-A; B – Rota dependente de coenzima-A; C – $\beta$ -oxidação; D – Descarboxilação não oxidativa; E – Redução da cadeia lateral.....	26

### CAPÍTULO II

Figure 1. Consumption (%) of 0.8 g.L <sup>-1</sup> ferulic acid by yeasts in preliminary screening...40	
Figure 2. Biotransformation of 2 g.L <sup>-1</sup> FA at initial pH 5.0 in <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A), UFMG-CM-Y2190 (B) and UFMG-CM-Y665 (C). (○) pH, (*) biomass, (■) glucose, (▶) ferulic acid, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Plots represent the mean of duplicates. ....43	
Figure 3. Biotransformation of 2 g.L <sup>-1</sup> FA in control experiments (pH 6.5) in <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A), UFMG-CM-Y2190 (B) and UFMG-CM-Y665 (C). (○) pH, (*) biomass, (■) glucose, (▶) ferulic acid, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Plots represent the mean of duplicates. ....47	
Figure 4. Biotransformation of 2 g.L <sup>-1</sup> FA in a two-step process by <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A), UFMG-CM-Y2190 (B) and UFMG-CM-Y665 (C). (○) pH, (*) biomass (▶) ferulic acid, (■) glucose, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Dashed line marks FA addition to culture medium. Plots represent the mean of duplicates. ....51	
Figure 5. Kinetics of <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 bioreactor cultivation in a 2-L bioreactor, with 2 g.L <sup>-1</sup> FA at 30 °C, 300 rpm and (A) 0.5 vvm air and pH set to 5.5, (B) 0.5 vvm air and pH set to 6.5 and (C) 2.5 vvm air and pH 5.5. (*) biomass, (■) glucose, (▶) ferulic acid, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Plots represent the mean of duplicates. ....54	
Figure 6. Metabolic pathway proposed for FA catabolism in <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647.....56	



Figure 7. Changes in UV absorbance of 0.1 g.L <sup>-1</sup> FA by FDC activity of <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647. (—) 0 h, (×) 2 h, (◆) 4 h and (∇) 6 h. ....	57
---	----

### CAPÍTULO III

Figura 1. Avaliação da cinética de consumo de açúcares de <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM- Y2190 (B) em hidrolisado ácido de arroz, em que (○) pH, (●) xilose, (▲) arabinose, (▼) ácido acético e (■) glicose. ....	72
--	----

Figura 2. Avaliação da cinética de consumo de açúcares de <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM- Y2190 (B) em hidrolisado ácido de aveia, em que (○) pH, (●) xilose, (▲) arabinose, (▼) ácido acético e (■) glicose. ....	74
--	----

Figura 3. Avaliação da cinética de consumo de fenólicos em <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM-Y2190 (B) em hidrolisado ácido de arroz, em que (▶) ácido ferúlico, (◇) ácido vanílico e (☆) vanilina. ....	77
---	----

Figura 4. Avaliação da cinética de consumo de fenólicos em <i>R. mucilaginosa</i> UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM-Y2190 (B) em hidrolisado ácido de aveia, em que (▶) ácido ferúlico, (◇) ácido vanílico e (☆) vanilina. ....	78
---	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1. Principais aromas fenólicos encontrados em alimentos e bebidas e seus descritores aromáticos. .... 19
- Tabela 2. Substratos e microrganismos utilizados para síntese de aromas vaniloides... 28

### CAPÍTULO II

- Table 1. Nine yeasts studied in this work, location and year of isolation. ....36
- Table 2. Kinetics parameters observed in pH 5 and control experiments. ....46
- Table 3. Yield ( $Y_{P/S}$ , g product.g<sup>-1</sup> substrate) and volumetric productivity ( $Q_P$ , mg.(L·h)<sup>-1</sup>) for two-step process and control experiments. ....49
- Table 4. Yield, productivity and FA consumption (%) obtained by *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 in bioreactor experiments in different pH and aeration conditions, 30 °C and 300 rpm, after 48 h. ....55

### CAPÍTULO III

- Tabela 1. Composição química (em g.L<sup>-1</sup>, em base úmida) dos hidrolisados ácidos de casca de aveia (HAAV) e casca de arroz (HAA). ....68
- Tabela 2. Produção máxima observada de ácido vanílico ( $P_{VA}$ ), em mg.L<sup>-1</sup>, e produtividade calculada, em mg.(L·h)<sup>-1</sup> das linhagens utilizadas neste trabalho. ....76

## LISTA DE ABREVIATURAS

ppm – Partes por milhão

ppb – Partes por bilhão

GRAS - Geralmente Reconhecidos como Seguros

POF – *Off-flavors* fenólicos (*phenolic off-flavors*)

EROS – Espécies reativas de oxigênio

4-VG – 4-vinilguaiacol (*4-vinylguaiacol*)

FDC – Ácido ferúlico descarboxilase (*ferulic acid decarboxylase*)

FCS – Feruloil-CoA sintetase (*feruloyl-CoA synthetase*)

HCHL - 4-hidroxicinamoil-CoA hidratase (*4-hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase*)

ATP – Adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*)

YM – *Yeast Malt*

HAA – Hidrolisado ácido de arroz

HAAV – Hidrolisado ácido de aveia

5-HMF – 5-hidroximetilfurfural

FA – Ácido ferúlico (*ferulic acid*)

VA – Ácido vanílico (*vanillic acid*)

V – Vanilina (*vanillin*)

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>16</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
1.1 AROMAS COMO ADITIVOS ALIMENTARES .....	16
1.1.1 Aromas sintéticos e naturais .....	17
1.1.2 Aromas fenólicos.....	18
1.1.3 Obtenção biotecnológica .....	21
1.2 MICRORGANISMOS POTENCIAIS PARA PRODUÇÃO DE AROMAS VANILOIDES .....	26
1.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	29
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>64</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	64
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.4 CONCLUSÃO .....	79
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a principal tendência de inovação da indústria de alimentos tem sido o uso da biotecnologia na obtenção de aditivos como corantes, espessantes e aromatizantes, além da produção de vitaminas, prebióticos e probióticos, visando melhorar as propriedades nutricionais e sensoriais de alimentos e bebidas. Os principais fatores que justificam este cenário incluem a demanda do mercado consumidor e a mudança nos comportamentos de compra e consumo, associados à minimização da geração de resíduos e o apoio a cadeias de produção socioambientalmente responsáveis.

Aromatizantes produzidos por via biotecnológica são legalmente classificados como aditivos naturais e, por isso, apresentam-se mais atrativos do ponto de vista econômico quando comparados aos flavorizantes sintéticos, principalmente em função da crescente demanda do mercado consumidor por produtos naturais. Dentro deste contexto, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de aprimorar a produção biotecnológica de aromatizantes (LONGO; SANROMÁN, 2006).

Além de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, os compostos fenólicos também estão associados com a qualidade nutricional e sensorial de diversos alimentos e bebidas, conferindo-lhes cor, no caso das antocianinas, e aroma em vinhos, cervejas, além de bebidas não alcoólicas como suco de laranja, molho de soja, entre outros. Dentre os principais aromas fenólicos, geralmente descritos como “picante” ou “medicinal”, destaca-se a importância do aroma de baunilha e o aroma de cravo (MAGA; KATZ, 1978).

O aroma de baunilha é um dos principais aromatizantes utilizados na indústria de alimentos e seu extrato natural é uma mistura complexa de aproximadamente 200 compostos aromáticos. A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) e o ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), são os principais compostos que conferem este aroma, entretanto estão presentes em baixas concentrações nos tecidos vegetais, o que dificulta sua extração e acarreta em baixos rendimentos, aumentando significativamente seu valor de mercado (WALTON; MAYER; NARBAD, 2014).

O aroma de cravo é caracterizado principalmente pelo composto 4-vinilguaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol), que além de alto poder aromatizante, pode ser utilizado como precursor de vanilina na síntese química e possui aplicação na indústria farmacêutica (BAQUEIRO-PEÑA et al., 2010). O 4-vinilguaiacol é comumente reportado em vinhos como resultado do metabolismo de linhagens de *Torulaspota*, *Brettanomyces* e

*Debaryomyces*, leveduras endógenas, naturalmente presente em uvas (HERNÁNDEZ-ORTE et al., 2008; SMITH; DIVOL, 2018).

A bioconversão de ácido ferúlico, lignina, eugenol e aminoácidos aromáticos através da aplicação de microrganismos oferece a possibilidade de obtenção destes aromas por via natural. O ácido ferúlico e a lignina são compostos encontrados principalmente na parede de células vegetais, em especial, grãos, farelos e cascas de cereais como milho, aveia, trigo, soja e cevada.

Nesse sentido, o presente trabalho apresenta um estudo visando a produção de aromas vaniloides através da utilização de leveduras, em meio sintético e hidrolisado, obtido a partir do aproveitamento de resíduos da agroindústria gaúcha, como casca de arroz e aveia. Ainda, estão descritos estudos relacionados ao crescimento de microrganismos produtores de aroma, em experimentos em frascos e biorreatores, avaliando a influência de parâmetros como pH e aeração.

Este trabalho encontra-se estruturado em capítulos. O Capítulo I apresenta uma breve revisão teórica pertinente ao desenvolvimento deste estudo. O Capítulo II encontra-se na forma de artigo científico, onde constam as metodologias empregadas na seleção de microrganismos produtores de aromas derivados do ácido ferúlico, bem como experimentos de fisiologia e crescimento celular das melhores linhagens, incluindo biorreatores, seus resultados e discussões. No Capítulo III, estão alguns resultados preliminares realizados com as leveduras selecionadas utilizando resíduos agroindustriais como substrato, mais precisamente hidrolisados de casca de aveia e casca de arroz. Por fim, no Capítulo IV, são discutidas as considerações finais deste trabalho, as principais conclusões e as perspectivas futuras acerca do objeto de pesquisa.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Investigar e avaliar a obtenção biotecnológica de aromas vaniloides como ácido vanílico, vanilina e 4-vinilguaiacol por linhagens de leveduras de *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Dekkera anomala* a partir de compostos fenólicos, especificamente ácido ferúlico em meio sintético.

### **Objetivos específicos**

- Selecionar linhagens de diferentes gêneros de leveduras que apresentem melhores níveis de crescimento e produção de aromas em meio sintético contendo ácido ferúlico;
- Estudar o crescimento e produção dos aromas das principais linhagens em hidrolisados de casca de aveia e arroz;
- Avaliar a influência do pH inicial e de uma etapa de pré-cultivo na conversão de ácido ferúlico e subsequente produção de aromas fenólicos em experimentos em frascos;
- Escalonar o processo de obtenção de aromas fenólicos da melhor linhagem testada em biorreatores de bancada, avaliando a influência do controle de pH e de aeração em cultivos submersos.

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1 AROMAS COMO ADITIVOS ALIMENTARES

Aromas e fragrâncias são fatores importantes na qualidade de alimentos, bebidas, cosméticos, sabonetes e produtos farmacêuticos (JANSSENS et al., 1992). A percepção de aromas é um processo dinâmico de uma série de eventos combinados de odor e sabor, aparência, textura e temperatura, que auxiliam na aceitação ou rejeição de um alimento pelo consumidor.

O sabor de um alimento é o resultado da presença de muitos componentes voláteis e não voláteis em matrizes complexas, que possuem diversas propriedades químicas e físico-químicas. Enquanto os compostos não voláteis contribuem principalmente para o sabor, os voláteis influenciam tanto o sabor quanto o aroma (LONGO; SANROMÁN, 2006).

Os aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias capazes de conferir ou intensificar o aroma e ou sabor dos alimentos e, embora não apresentem nenhuma função nutritiva ou vitamínica, diversas bioatividades (antimicrobiana e anticarcinogênica, por exemplo) têm sido relatadas (BERGER, 1995).

Compostos de aroma podem ser obtidos de fontes vegetais e animais, bem como sintetizados química ou biologicamente. Eles não apresentam uma função química específica: podem ser hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres ou lactonas (ésteres cíclicos), éteres, e outros compostos resultantes do metabolismo de plantas ou de determinadas fontes animais. Em geral, os compostos de aroma estão presentes em quantidades muito pequenas na composição dos alimentos, geralmente por volta de 50 ppm, já que muitos possuem um limiar de detecção (*threshold*) na ordem de partes por bilhão (ppb) (VANDAMME, 2003).

De acordo com o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes (BRASIL, 2007), os aromatizantes podem ser classificados em: natural, artificial ou artificial idêntico ao natural. Embora a síntese química seja o método mais comumente empregado na obtenção de compostos de aroma, o apelo comercial acerca da denominação “natural” de aromas obtidos por extração direta ou via biotecnológica mostra-se cada vez mais atrativo para a indústria e para o mercado consumidor (LONGO; SANROMÁN, 2006).



### 1.1.1 Aromas sintéticos e naturais

Aromatizantes naturais são aqueles obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias primas aromatizantes naturais, como produtos de origem animal ou vegetal que contenham substâncias odoríferas ou sápidas (BRASIL, 2007).

O emprego de plantas como fonte de extração de aromas naturais, apesar de utilizar recursos renováveis, apresenta algumas limitações em seu processo como a influência da variação sazonal e, em alguns casos, baixo rendimento da operação em função da baixa concentração dos compostos voláteis nos tecidos vegetais, o que acarreta em um elevado custo para o produto final (BICAS et al., 2010).

Os aromatizantes artificiais – idênticos ao natural ou não – são compostos obtidos através de síntese química, que representam uma sequência de processos prejudiciais ao meio ambiente, podendo levar à formação de misturas racêmicas indesejáveis, provocando uma redução na eficiência do processo e aumentando os custos de purificação (VANDAMME, 2003).

A obtenção química de aromas, embora compatível com a demanda atual do mercado, apresenta uma série de limitações e desvantagens em função da baixa seletividade das reações, o que acarreta em baixos rendimentos, formação de produtos indesejáveis, aumento nos custos de produção e purificação, além de gastos energéticos elevados em decorrência dos parâmetros aplicados durante a síntese (altas pressões e temperaturas) e geração de resíduos poluentes pelo uso de solventes orgânicos, como o hidróxido de sódio (AKACHA; GARGOURI, 2015).

As desvantagens de ambos os métodos e o crescente interesse em produtos naturais pelo mercado consumidor têm direcionado diversos estudos em busca de novas estratégias biotecnológicas para produzir aromas naturais com a aplicação de células vegetais, culturas de tecidos, microrganismos e suas enzimas como biocatalisadores, proporcionando maior controle das variáveis durante o processo de produção.

Os insumos alimentícios produzidos através da aplicação de bioprocessos – bioaromas, corantes naturais, entre outros aditivos – além de possuírem o *status* legal de produto natural e seguro (para este processo devem ser utilizados apenas microrganismos GRAS, sigla para “Geralmente Reconhecidos como Seguros”) são também alternativas ecologicamente sustentáveis, pois podem ser obtidos a partir da utilização de resíduos e subprodutos gerados pelo processamento de alimentos como bagaços, cascas e outros

resíduos aquosos, como por exemplo, milhocina e soro de leite, agregando valor à estes substratos e diminuindo o impacto provocado pelo descarte destes resíduos na natureza (BERGER, 2015; BICAS et al., 2010).

A principal desvantagem relacionada a biossíntese de aromas é a baixa concentração de alguns compostos e consequente baixa recuperação após a extração, um limitante do ponto de vista industrial que dificulta a produção em larga escala (DIONÍSIO et al., 2012).

### *1.1.2 Aromas fenólicos*

Os compostos fenólicos são compostos químicos que apresentam na sua estrutura pelo menos um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila ligados. Podem ser classificados pelo número e disposição dos átomos de carbono e comumente estão ligados à açúcares e ácidos orgânicos (HO, 1992). Estes compostos podem ser sintetizados por plantas durante seu desenvolvimento como metabólitos secundários, derivados principalmente da via das pentose-fosfato, via do xikimato ou como resultado da síntese de fenilpropanoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Em alimentos, os compostos fenólicos são principalmente encontrados na forma de ácidos fenólicos (fenólicos simples), derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). Além de suas propriedades antioxidantes largamente documentadas, os compostos fenólicos podem contribuir diretamente na percepção de aromas e sabores desejáveis ou indesejáveis em alimentos (Tabela 1), além de conferir cor no caso das antocianinas (BRAVO, 2009; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Nesta revisão, aprofundaremos apenas os compostos fenólicos que caracterizam os aromas de cravo e baunilha, principais aromatizantes aplicados na indústria de alimentos e presentes em algumas bebidas em decorrência da ação de microrganismos. Os aromas vaniloides, como são chamados, recebem esta nomenclatura em função da presença do grupo vanilil (vaniloide) em estrutura química, compostos por um grupo fenol e um éter.

Tabela 1. Principais aromas fenólicos encontrados em alimentos e bebidas e seus descritores aromáticos.

Composto	Descritores de aroma
4-Vinilfenol	Amêndoas, medicinal
4-Vinilguaiacol	curral, cravo
4-Etilguaiacol	picante, cravo
Isoeugenol	floral
Guaiacol	fumaça, medicinal
4-Metilguaiacol	fumaça, picante, verde
Vanilina	baunilha, doce
Ácido vanílico	baunilha

Fonte: Flavornet (<http://www.flavornet.org/flavornet.html>)

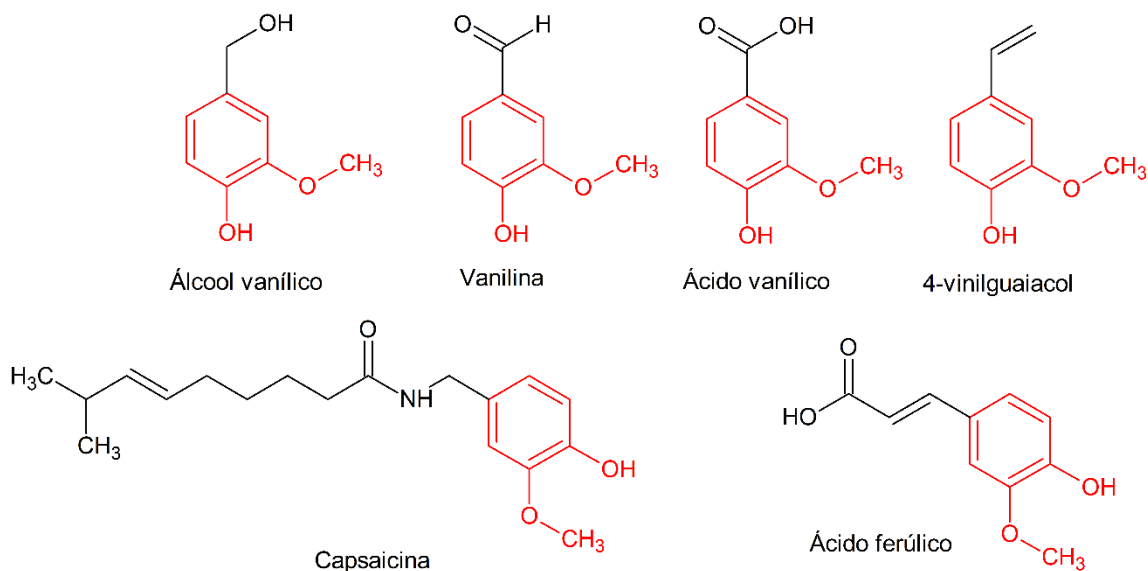
O aroma de baunilha é um dos aromatizantes mais apreciados no mundo e um importante flavorizante para alimentos, bebidas, além de ser utilizado em alguns produtos farmacêuticos. O extrato natural de baunilha é uma mistura complexa de aromas extraído das vagens de duas espécies diferentes de orquídeas (*Vanilla planifolia* e *Vanilla tahitensis*), com aproximadamente 200 compostos em seu perfil aromático, como vanilina, ácido vanílico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzoico e álcool 4-hidroxibenzílico (RAO; RAVISHANKAR, 2000).

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é o composto que mais contribui para o aroma típico de baunilha, com concentrações entre 1-2 % em peso nas vagens das plantas. É um aldeído aromático, sólido, de cor branca, com aroma doce, agradável e intenso. Possui baixa solubilidade em água a temperatura ambiente, mas é solúvel em altas temperaturas, álcool e éter (KAUR; CHAKRABORTY, 2013). Também pode atuar na prevenção de doenças, pois trata-se de um composto fenólico com propriedades antimutagênicas, antioxidantes, conservantes e antimicrobianas (DAUGSCH; PASTORE, 2005).

O ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) é um composto com diversas aplicações químicas, biológicas, agrícolas e também na área medicinal. Da mesma forma que a vanilina, o ácido vanílico possui propriedades antioxidante, anticarcinogênica e apresenta potencial inibitório contra microrganismos patogênicos como, por exemplo, *Listeria monocytogenes* (DELAQUIS; STANICH; TOIVONEN,

2005). Na indústria química, além de ser utilizado como precursor para síntese artificial de vanilina, é possível a utilização do ácido vanílico como monômero na síntese de poliésteres (BOCK; ANDERSON, 1955).

Figura 1. Estruturas químicas de compostos que apresentam grupo vaniloide (estrutura em vermelho).



Fonte: autor.

Compostos fenólicos como 4-vinilguaiacol (2-metoxi-4-vinilfenol) e 4-vinilfenol são produtos derivados da reação de descarboxilação do ácido ferúlico e ácido  $p$ -coumárico, respectivamente, em uma reação catalisada pela ação de enzimas chamadas descarboxilases (COGHE et al., 2004). Estes compostos são comumente descritos como *off flavors* fenólicos (POF, *phenolic off flavors*) (CHATONNET et al., 1993; MCMURROUGH et al., 1996), geralmente associados a deterioração de bebidas não alcólicas e alcólicas pela multiplicação de leveduras contaminantes, como *Dekkera/Brettanomyces*, *Rhodotorula* e *Candida* (DONAGHY; KELLY; MCKAY, 1999; HARRIS et al., 2008; SMITH; DIVOL, 2018; SUTHERLAND et al., 1995).

O composto 4-vinilguaiacol, que possui aroma característico de cravo, apresenta uma significativa importância em diversos alimentos na indústria, como molho de soja e como aroma principal de cervejas de trigo, especialmente Belgian Blond Ale, Weissbier e cervejas de fermentação espontânea como Lambic e Gueuze (MAGA; KATZ, 1978; MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007). Além disso, este composto possui um *threshold* extremamente baixo, em torno de 0,30 ppm, o que resulta em um aroma

“fenólico” ou “medicinal” bastante persistente mesmo em pequenas concentrações nos alimentos (MEILGAARD, 1975).

Embora a obtenção destes compostos aromáticos por via natural possua atrativo valor comercial – por exemplo, o valor de mercado da vanilina naturalmente extraída varia de US\$ 1.200 por kg até mais de US\$ 4.000 por kg (WALTON; MAYER; NARBAD, 2014) – o processo de extração natural destes não é suficiente para atender sozinha a demanda mundial da indústria de aromatizantes.

Neste cenário, a produção biotecnológica destes compostos representa uma alternativa promissora com maiores vantagens em comparação aos métodos tradicionais de síntese. Além de ser um produto natural, com impacto altamente positivo no mercado consumidor, a síntese de bioaromas envolve processos que apresentam alta enantioseletividade, o que permite a obtenção de produtos com elevada pureza ótica e com melhores características sensoriais; produção contínua e sem impacto ou interferência sazonal; maior controle e otimização de parâmetros, objetivando a diminuição de gastos energéticos e uso de reagentes nocivos ao meio ambiente (BERGER, 2015; FELIPE; OLIVEIRA; BICAS, 2017).

### 1.1.3 Obtenção biotecnológica

Diversas abordagens biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas para a produção de aromas fenólicos pela bioconversão de precursores como lignina, isoeugenol, eugenol, ácido ferúlico e outros aminoácidos aromáticos, além de síntese *de novo* através da aplicação de fungos, bactérias – geneticamente modificados ou não – e culturas de células vegetais.

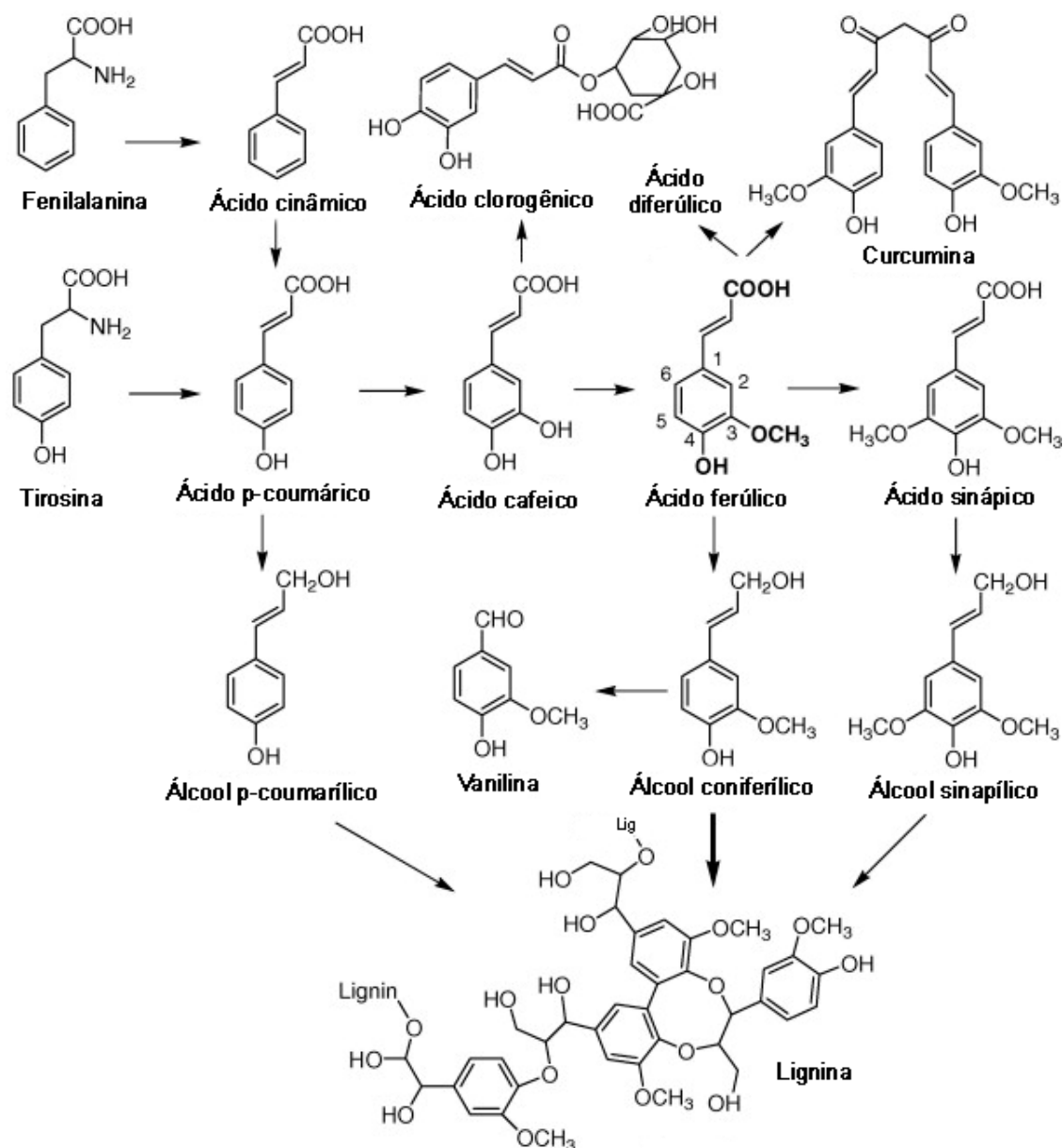
O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é um composto fenólico encontrado principalmente na parede de células vegetais, como gramíneas, grãos, farelos e cascas de arroz, milho, trigo e outros cereais, além de madeira. Este composto raramente ocorre na natureza em sua forma livre, aparecendo de forma esterificada aos polissacarídeos da parede celular, especialmente arabinose, que conseqüentemente é ligada à xilana, indicando que o ácido ferúlico é derivado, portanto, de arabinoxilanas ferúlicas (COGHE et al., 2004).

Com relação às propriedades biológicas do ácido ferúlico, destacam-se sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatório e principalmente potencial antioxidante. A capacidade antioxidante do ácido ferúlico está relacionada com a desativação de espécies

reativas de oxigênio (EROS), como peróxido de hidrogênio e superóxido. Esta propriedade é conferida estruturalmente em função de seu núcleo fenólico e da cadeia lateral vinílica que formam uma estrutura em ressonância estável durante a reação do ácido ferúlico com o radical livre (GRAF, 1992).

A ocorrência do ácido ferúlico em plantas acontece a partir da via metabólica do ácido shikímico, a partir de aminoácidos como L-fenilalanina e L-tirosina como precursores (ROSAZZA et al., 1995) durante a biossíntese de lignina, sendo a forma *trans* a mais abundante na natureza (Figura 2). A fenilalanina e a tirosina são inicialmente convertidos em ácido cinâmico e *p*-cumárico pelas enzimas fenilalanina amônia liase e tirosina amônia liase, respectivamente. Em seguida, o ácido *p*-cumárico é convertido em ácido ferúlico através de reações de hidroxilação e metilação sequenciais (GRAF, 1992).

Figura 2. Esquema das reações envolvidas na síntese de lignina em plantas.

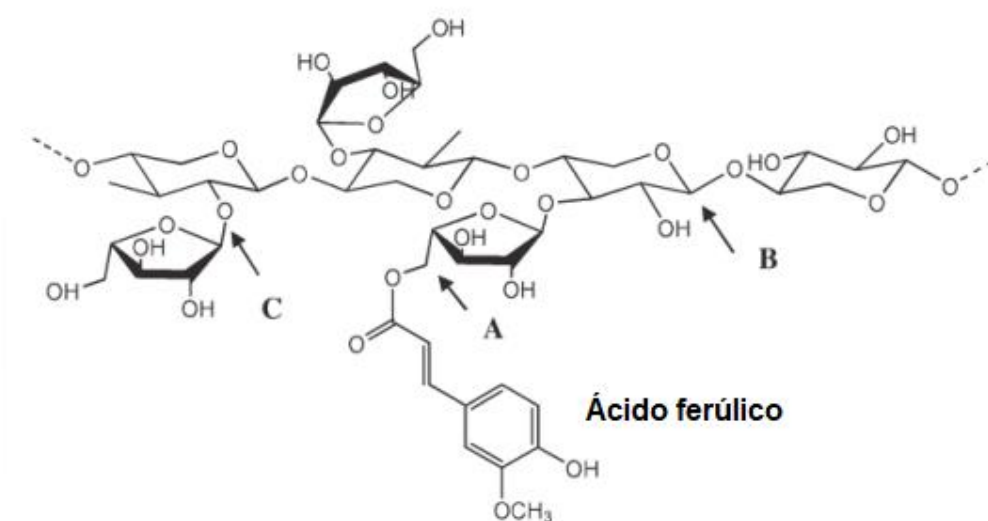


Fonte: adaptado de Zhao e Moghadasian (2008).

Resíduos agroindustriais, especialmente os de cereais, apresentam forte potencial de utilização como substrato para a biossíntese de compostos aromáticos fenólicos, uma vez que são fontes de ácidos hidroxicinâmicos. Para isso, diversos pré-tratamentos como a hidrólise química ácida ou alcalina podem ser aplicados para promover a quebra das ligações covalentes entre as estruturas da planta (Figura 3) e a subsequente liberação de ácido ferúlico ao meio (CRUZ; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2005; MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2007; SUN et al., 2018; TORRE et al., 2008; TORRES et al., 2009). Ainda, é possível a utilização de um pré-tratamento enzimático, onde enzimas

como feruloil esterases, celulases e xilanasas podem ser aplicadas com o objetivo de facilitar a despolimerização da lignina e solubilização do ácido ferúlico para sua utilização como fonte de carbono (DI GIOIA et al., 2007; FAULDS; WILLIAMSON, 1995; THIBAUT et al., 1998).

Figura 3. Estrutura do ácido ferúlico esterificado a unidades de arabinose de arabinoxilana.



Fonte: adaptado de MARTINS et al. (2011).

Diversos mecanismos são citados na literatura envolvendo a degradação do ácido ferúlico pela ação de microrganismos (Figura 4), cujas rotas metabólicas são diferenciadas de acordo com a reação inicial: descarboxilação não oxidativa;  $\beta$ -oxidação; redução da cadeia lateral e deacetilação dependente de coenzima-A ou não (GALLAGE; MØLLER, 2015).

Durante a descarboxilação não oxidativa, ocorre majoritariamente a formação de estirenos como o 4-vinilguaiacol, além de outros compostos quinoides como metabólitos intermediários. Esta rota é característica do metabolismo de diferentes microrganismos (ROSAZZA et al., 1995), como *Enterobacter* sp. Px6-4 (LI et al., 2008) e algumas espécies de *Lactobacillus* (KAUR; CHAKRABORTY; KUMAR, 2013) e está associada principalmente com a ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase (FDC, EC 4.1.102), que atua na diminuição dos efeitos tóxicos da vanilina à célula microbiana através da redução espontânea deste composto a outros de menor toxicidade, como é o caso do álcool e ácido vanílico (COGHE et al., 2004; MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007).

No caso de rotas dependentes ou não de coenzima A, a mais comum em microrganismos são as reações que necessitam da presença desta molécula no meio

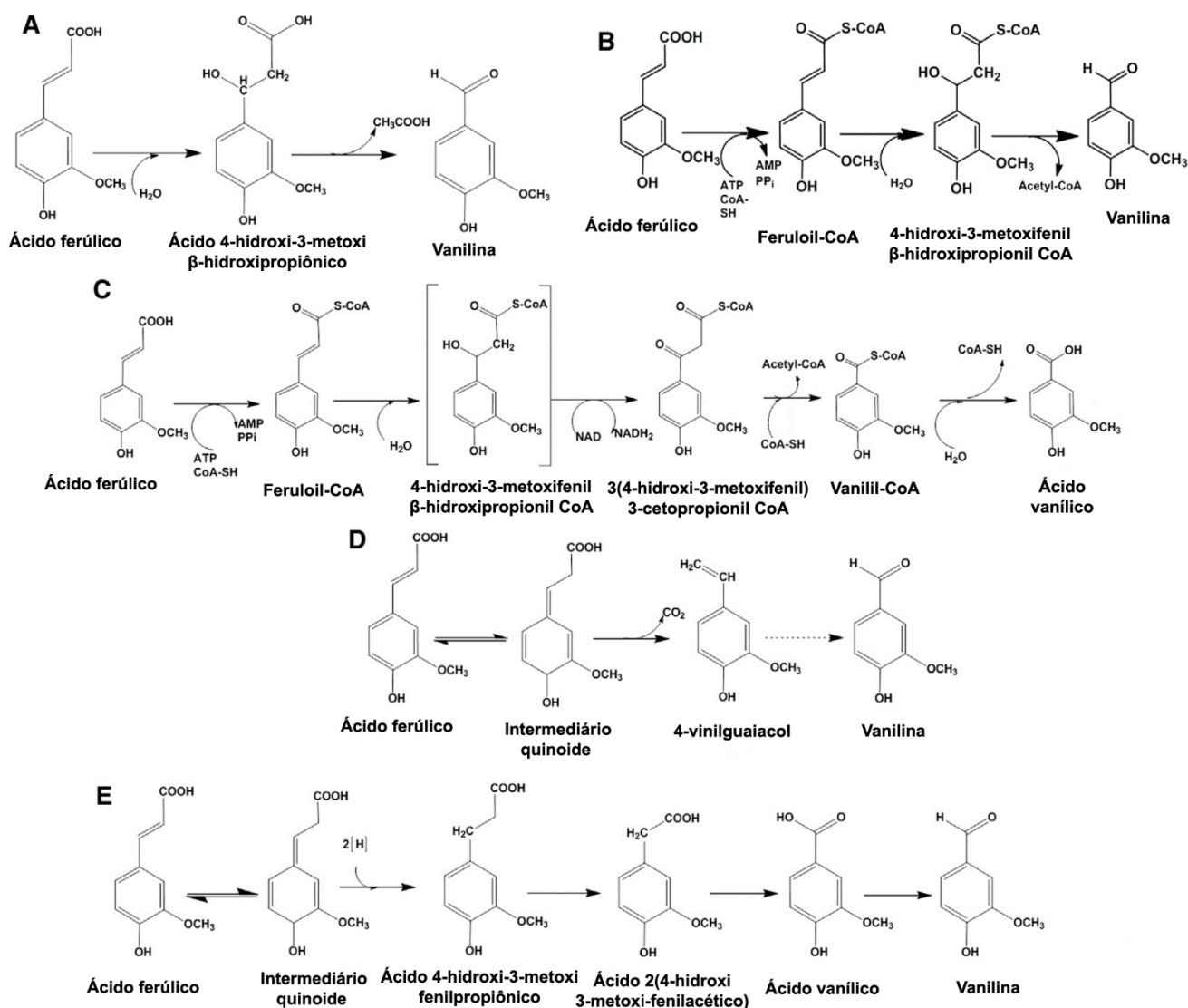


reacional. Neste caso, a reação inicia com a transformação do ácido ferúlico em feruloil-CoA pela ação da enzima feruloil-CoA sintetase, sendo obrigatória a presença de coenzima A, adenosina trifosfato (ATP) e  $MgCl_2$  como cofatores nesta etapa. Em seguida, com a ação de outra enzima (4-hidroxicinamoil-CoA hidratase, HCHL), um intermediário transiente é formado e pode ser então convertido em vanilina e acetil-CoA, ao final da reação. Este tipo de catabolismo do ácido ferúlico foi relatado primeiramente em *Pseudomonas fluorescens* (NARBAD; GASSON, 1998).

A  $\beta$ -oxidação, também dependente de coenzima A, inicia com a conversão do ácido ferúlico em feruloil-CoA novamente pela ação da enzima FCS e, a partir de reações sequenciais, é transformada em ácido vanílico. Neste caso, a presença de cofatores não é requerida. O mecanismo envolvido nesta reação é análogo ao envolvido no metabolismo de ácidos graxos, envolvendo a formação de um intermediário quinoide. Huang *et al.* (1993) descreveu este mecanismo ao avaliar a biotransformação de ácido ferúlico sintético por células livres de *Rhododurula rubra*, demonstrando a formação de ácido vanílico e sua conversão posterior a guaiacol, via descarboxilação.

Em alguns microrganismos é possível observar a degradação do ácido ferúlico por mais de uma rota metabólica. Em estudos utilizando *Debaryomyces hansenii* em meio sintético, Mathew *et al.* (MATHEW; ABRAHAM; SUDHEESH, 2007) sugeriu que a bioconversão de ácido ferúlico segue duas alternativas: a primeira, via descarboxilação não oxidativa catalisada pela reação da enzima FDC, promove a conversão de ácido ferúlico em altas concentrações de 4-vinilguaiacol ( $1,47 \text{ g.L}^{-1}$ ); em seguida, a via de  $\beta$ -oxidação é ativada, promovendo a oxidação deste composto a vanilina, com formação transiente de álcool vanílico.

Figura 4. Rotas de degradação do ácido ferúlico. A – Rota independente de coenzima-A; B – Rota dependente de coenzima-A; C –  $\beta$ -oxidação; D – Descarboxilação não oxidativa; E – Redução da cadeia lateral.



Fonte: adaptado de Gallage e Møller (2015).

## 1.2 MICRORGANISMOS POTENCIAIS PARA PRODUÇÃO DE AROMAS VANILOIDES

Espécies de bactérias, fungos e leveduras já foram utilizadas em estudos visando a produção biotecnológica, a partir de diversos precursores como substrato, como pode ser observado na Tabela 2.

A aplicação de técnicas de engenharia genética e o uso de microrganismos recombinantes são exemplos de outras metodologias que vêm sendo aprofundadas neste

aspecto, com o objetivo principal de maximizar a produção de vanilina, diminuindo seus efeitos tóxicos, além de auxiliar a compreender de forma mais clara o mecanismo de conversão das rotas metabólicas (CHAKRABORTY; GUPTA; KAUR, 2016; DI GIOIA et al., 2011; HANSEN et al., 2009; TORRES et al., 2009).

As maiores concentrações de vanilina foram relatadas em espécies de *Streptomyces* e *Amycolatopsis*, demonstrando que algumas espécies de actinomicetos são altamente eficientes na utilização de ácidos hidroxicinâmicos, em virtude de seu ciclo de vida saprofítico e sua proximidade com plantas e solo, o que contribui positivamente na biossíntese de vanilina e outros fenilpropanoides (CHATTOPADHYAY; BANERJEE; SEN, 2018; PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2016; SALGADO et al., 2012). Diversos estudos relatam a correlação entre o metabolismo de microrganismos e o ambiente em que foram isolados, um exemplo disso são algumas espécies de fungos decompositores de madeira denominados basidiomicetos, uma vez que os álcoois constituintes da lignina são facilmente degradados por esta classe de microrganismos (BERGER, 1995).

A conversão direta da biomassa lignocelulósica, sem a aplicação de pré-tratamentos, em compostos de menor peso molecular como vanilina, ácido vanílico, ácido ferúlico, aldeído coniferílico e seus derivados também pode ser obtida pela ação de fungos filamentosos e suas enzimas lignolíticas. Microrganismos como *Pycnoporus cinnabarinus*, *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium* são alguns exemplos que apresentam a capacidade de deslignificar resíduos agroindustriais e tipos de madeira, através de alterações oxidativas e despolimerização progressiva da lignina (BARBOSA et al., 2008).

Em leveduras, são poucos os estudos que demonstram bons rendimentos com relação a este composto e isto deve-se principalmente à toxicidade celular da vanilina. Em geral, concentrações de vanilina acima de 1 g.L<sup>-1</sup> possuem efeito inibitório no crescimento de microrganismos (DAUGSCH; PASTORE, 2005). Os metabólitos mais comuns entre estes microrganismos são o 4-vinilguaiacol, 4-etilfenol, ácido vanílico e álcool vanílico, compostos de menor toxicidade, mas que possuem impacto aromático importante em diversos alimentos e bebidas.

Tabela 2. Substratos e microrganismos utilizados para síntese de aromas vaniloides.

Substrato	Microrganismo	Produto (s)	Referência
Eugenol	<i>Pseudomonas</i> sp. HR199	Vanilina	Overhage <i>et al.</i> (1999)
	<i>Bacillus fusiformis</i> SW-B9	Vanilina	Zhao <i>et al.</i> (2005)
Isoeugenol	<i>Bacillus pumilus</i> S-1	Vanilina	Hua <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudomonas putida</i> IE27	Ácido vanílico	Yamada <i>et al.</i> (2007)
	<i>Candida galli</i>		Ashengroph <i>et al.</i> (2011)
	<i>Rhodotorula rubra</i>	Ácido vanílico	Huang <i>et al.</i> (1993)
		Guaiacol	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ácido vanílico	Narbad e Gasson (1998)
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Vanilina	Zheng <i>et al.</i> (2007)
	<i>Bacillus aryabhatai</i> BA03	4-vinilguaiacol	Paz <i>et al.</i> (2018)
		Vanilina	
	<i>Brettanomyces anomalus</i>	4-vinilguaiacol	Edlin <i>et al.</i> (1995)
		4-etilguaiacol	
	<i>Amycolatopsis</i> sp. ATCC 39116	4-vinilguaiacol	Pérez-Rodríguez <i>et al.</i>
		Ácido vanílico	(2016)
Ácido ferúlico		Vanilina	
	<i>Streptomyces sannanensis</i>	Ácido vanílico	Ghosh <i>et al.</i> (2007)
	<i>Escherichia coli</i> JM109/pBB1	Ácido vanílico	
		Álcool vanílico	Torres <i>et al.</i> (2009)
		Vanilina	
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	4-vinilguaiacol	
		Vanilina	Mathew <i>et al.</i> (2007)
		Álcool vanílico	
	<i>Pediococcus acidilactici</i> BD16	Vanilina	
		Álcool vanílico	Chakraborty <i>et al.</i> (2017)
		Ácido vanílico	
Glicose	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> recombinante	Vanilina	Hansen <i>et al.</i> (2009)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante		

### 1.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas fibrosas e rígidas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, entremeados pela lignina, uma macromolécula formada por álcoois aromáticos, e encontram-se unidos geralmente por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997).

Os resíduos lignocelulósicos podem ser de origem agrícola (bagaço e palha da cana de açúcar, casca de soja, palha de trigo), florestal (especialmente eucalipto) ou industrial – como é o caso da indústria papelreira (KUHAD; SINGH, 1993).

Do ponto de vista biotecnológico, a composição química de resíduos lignocelulósicos é bastante interessante uma vez que são substratos ricos em polissacarídeos. A composição destes materiais é bastante variável, dependendo principalmente da espécie, época de colheita e condições de crescimento. Geralmente, os resíduos lignocelulósicos são compostos de 30 % a 50 % de celulose, 15 % a 35 % de hemicelulose e 10 % a 25 % de lignina (IQBAL; KYAZZE; KESHAVARZ, 2013; MARTINS et al., 2011).

O arroz (*Oryza sativa*) é uma das principais culturas de cereais no mundo, precedida apenas do milho e do trigo. A cultura de arroz possui importante destaque no cenário agroindustrial de países em desenvolvimento, como a China, Índia e Brasil (FAO, 2013). O Rio Grande do Sul é o principal produtor e beneficiador do cereal no Brasil, correspondendo a aproximadamente 70 % da produção total do país (12.452 milhões de toneladas) no ano de 2017 (IBGE, 2018). A casca do arroz, gerada nas etapas iniciais do processamento deste cereal, representa 20 % do peso seco e, desta forma, estima-se que a produção em 2017 deste rejeito tenha sido de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas (YU et al., 2009).

Durante o beneficiamento, 70 % das cascas geradas são queimadas para obtenção de energia na própria beneficiadora e os restantes 30 % direcionados para outros fins, tais como uso em olarias, como substrato ou adubo para plantas e cama para aves, além do descarte na natureza, pois sua baixa digestibilidade e alto teor de cinzas não permite a possibilidade de oferta-la como ração animal (DIAS et al., 2012; SAHA; COTTA, 2010).

A composição química da casca de arroz é bastante atrativa do ponto de vista biotecnológico, com excelente potencial para produção de bioprodutos e biocombustíveis em função de seu elevado conteúdo de celulose, em torno de 30 % a 38 %, além de

hemicelulose, 12 - 28 %, e lignina entre 15 a 29 % (HICKERT, 2010; ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003).

No Brasil, a aveia (*Avena sativa*) é cultivada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Em 2017, a produção brasileira foi de aproximadamente 609 mil toneladas, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 66,83 % deste volume (407.098 t) (IBGE, 2018). A casca de aveia é um subproduto da moagem do grão e representa de 25 % a 30 % do peso do mesmo. Sua principal função é proteger o grão contra fatores do ambiente e o ataque de patógenos, logo, durante o processamento do grão é descartada, tornando-se um poluente ao meio ambiente (TAMANINI et al., 2004). A casca de aveia contém cerca de 31 % a 35 % de celulose, 20 % a 28 % de hemicelulose e 10 % a 23 % de lignina (TAMANINI et al., 2004).

A utilização de resíduos agroindustriais lignocelulósicos como substrato em bioprocessos representa uma alternativa altamente promissora, pois significa a redução de custos ao processo com relação à formulação de meios de crescimento, além de auxiliar na diminuição do impacto ambiental provocado por estes resíduos na natureza e agregar valor à potenciais fontes de nutrientes na obtenção de bioprodutos.

## CAPÍTULO II

### **Bioconversion of ferulic acid into aromatic compounds by newly-isolated yeast strains of the Latin American biodiversity**

Os resultados referentes ao estudo da cinética de crescimento de leveduras isoladas no bioma brasileiro em meio sintético contendo ácido ferúlico estão apresentados na forma de artigo, submetido para publicação na revista *Process Biochemistry*.

1     **Bioconversion of ferulic acid into aromatic compounds by newly isolated yeast**  
2                     **strains of the Latin American biodiversity**

3  
4     Giulia Bettio<sup>a</sup>, Luíza Caroline Zardo<sup>a</sup>, Carlos Augusto Rosa<sup>b</sup>, Marco Antônio Záchia  
5                     Ayub<sup>a\*</sup>

6  
7     <sup>a</sup>Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology  
8     Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

9     <sup>b</sup>Department of Microbiology, ICB, C.P. 486, State University of Minas Gerais, Belo  
10    Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

11  
12    \* Corresponding author:

13    Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048

14    Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970

15    E-mail address: mazayub@ufrgs.br (M. A. Z. Ayub)

16



## 1 Abstract

2           Nine yeast strains isolated from Latin American biodiversity were screened for  
3 ferulic acid consumption and conversion into flavor compounds such as vanillin, vanillic  
4 acid and 4-vinylguaiacol. Selected strains (*Rhodotorula mucilaginosa* UFMG-CM-  
5 Y3647, UFMG-CM-Y2190, UFMG-CM-Y665) were evaluated in flask experiments to  
6 investigate the influence of pH media on bioconversion and a two-step process was  
7 conducted aiming to maximize the metabolites production. Effect of pH was found to be  
8 significantly important for ferulic acid bioconversion, as acidic conditions ( $\text{pH} < 6.0$ )  
9 improved VA accumulation, with highest production of  $1.14 \pm 0.02$  and  $1.25 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$   
10 <sup>1</sup> from UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y2190, respectively. Two-step process  
11 favored 4-VG production for most strains, being UFMG-CM-Y2190 the best producer,  
12 cultures reaching  $1.63 \pm 0.09 \text{ g.L}^{-1}$  after 55 h, showing a productivity of  $29.59 \pm 1.55$   
13  $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , as glucose affected the metabolites pool and redirected yeast metabolism. *R.*  
14 *mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 was selected for scaled-up cultivations in a 2-L  
15 bioreactor, where pH-controlled pH 5.5 and aeration of 2.5 vvm was found to be the best  
16 condition to improve VA productivity, with concentrations of  $1.20 \pm 0.02 \text{ g.L}^{-1}$  (78 %  
17 molar yield) and productivity of  $40.82 \pm 0.57 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ .

18

19 **Keywords:** Bioconversion; aroma compounds; *Rhodotorula mucilaginosa*; ferulic acid;  
20 vanillic acid; 4-vinylguaiacol

## 1 INTRODUCTION

2 In recent years, the main innovation trend in food industry has been the use of  
3 biotechnology techniques to produce additives such as colorants and flavorings, besides  
4 the production of vitamins, enzymes, prebiotics and probiotics, aiming to improve the  
5 nutritional and sensory properties of foods and beverages. Consumers market demand  
6 and changes in purchasing and consumption behavior are the main factors that explain  
7 this scenario, among the increasing concern to minimize waste generation and support  
8 eco-friendly supply chains.

9 Flavorings produced biotechnologically are legally classified as natural additives  
10 and, therefore, more attractive from an economic point of view when compared to  
11 synthetic flavorings, mainly due to the growing perception and desire for natural products  
12 by people [1]. Within this context, several studies have been developed with the objective  
13 of improve the biotechnological production of flavorings [2–4].

14 Phenolic compounds are a group of substances that not only shows antioxidant  
15 properties [5], but can contribute to the perception of aromas and flavors in foods, besides  
16 providing color in the case of anthocyanins [6,7]. Ferulic acid (FA) is a phenolic  
17 compound found mainly in plant cell wall, such as grasses, grains, bran and rice husks,  
18 corn, wheat and other cereals [8,9]. Several microorganisms are capable to utilize ferulic  
19 acid (natural or synthetic) as carbon source and convert it into vanillin, vanillic acid and  
20 other value-added products such as guaiacol, 4-vinylguaiacol and protocatechuic acid, the  
21 final product depending on the degradation pathway of bacteria, fungi or yeasts being  
22 used [10,11].

23 Vanillin (V) is the main compound found in vanilla flavor, present in  
24 concentrations up to 1-2 % (w/w) in *Vanilla planifolia* beans [12]. Vanillin has also some  
25 pharmacological properties, acting in diseases prevention, as it is a phenolic compound  
26 with antimutagenic, antioxidant, preservative and antimicrobial properties [13]. Vanillic  
27 acid (VA) is a compound with chemical, biological and medicinal applications. It also  
28 presents antioxidant and anticarcinogenic properties, and has inhibitory potential against  
29 pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes* [14]. 4-vinylguaiacol (4-VG)  
30 is another phenolic compound with significant impact in food and beverages flavor, with  
31 characteristic ‘clovy’ and ‘spicy’ notes, often associated with the metabolism of spoilage  
32 yeasts, such as *Dekkera/Brettanomyces*, *Rhodotorula* and *Candida* [15–17]. It is present  
33 in soy sauce, dairy products and it appears as the main aroma of wheat beers, especially

1 Belgian Blond Ale, Weissbier and spontaneous fermentation beers such as Lambic and  
2 Gueuze [15,18].

3 In this context, biotechnological production of these compounds rises as a  
4 promising alternative with greater advantages when compared to traditional synthesis  
5 methods. Bio-flavors can be continuously produced without seasonal interference and  
6 present easy control and optimization of parameters, which helps to reduce energy costs  
7 and the use of reagents harmful to the environment [3,19]. The study of strains able to  
8 use renewable sources to produce significant aroma compounds to food industry is of  
9 great interest to reduce the need of chemical synthesis and waste generation of agro-  
10 industrial residues.

11 The aim of this work was to screen nine yeast strains, isolated from Latin  
12 American biodiversity from different environments and select the best strains capable of  
13 metabolizing ferulic acid and convert it into added-value products such as vanillin,  
14 vanillic acid and 4-vinylguaiacol. The selected strains were first evaluated in flasks-  
15 culturing experiments in order to investigate the influence of pH media on bioconversion  
16 and a two-step process was conducted aiming to maximize the metabolites production.  
17 Scale-up cultivations of the best strain was carried out in bioreactor cultivations, with pH  
18 control and evaluation of different aeration regimes rates.

19

## 1 MATERIALS AND METHODS

2

### 3 Materials and strains

4 Yeast strains used in bioconversion experiments were isolated from soil samples  
 5 of different regions of Brazil and Ecuador and were kindly provided by the Collection of  
 6 Microorganisms and Cells of Federal University of Minas Gerais (UFMG, Minas Gerais,  
 7 Brazil) are listed in Table 1. The nine yeast strains are currently stored in the Bioteclab  
 8 yeast collection (Food Science and Technology Institute, UFRGS, Brazil) and working  
 9 stocks were stored in a medium containing glycerol 40 % at -80 °C. For metabolic active  
 10 biomass, strains were cultivated in solid YM (Yeast Malt) medium containing 1 %  
 11 dextrose, 0.5 % peptone, 0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 2 % agar and were kept  
 12 at 4 °C.

13

14 Table 1. Nine yeasts studied in this work, location and year of isolation.

Specie	Strain	Location	Year of isolation
<i>Debaryomyces hansenii</i>	UFMG-CM-Y1736	Santa Bárbara, Minas Gerais	2014
<i>Debaryomyces hansenii</i>	UFMG-CM-Y2771	Palmas, Tocantins	2011
<i>Debaryomyces hansenii</i>	UFMG-CM-Y5635	Angra dos Reis, Rio de Janeiro	2013
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	UFMG-CM-Y2681	Santa Bárbara, Minas Gerais	2011
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	UFMG-CM-Y3812	Belo Horizonte, Minas Gerais	2008
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UFMG-CM-Y665	Aurora do Tocantins, Tocantins	2011
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UFMG-CM-Y2190	Angra dos Reis, Rio de Janeiro	2013
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UFMG-CM-Y3647	Aurora do Tocantins, Tocantins	2012
<i>Dekkera anomala</i>	UFMG-CM-Y4734	San Antonio, Ecuador	-

15

16

### 17 Reagents

18 *Trans*-ferulic acid (99 %, *trans*-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) and  
 19 standards of vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid), vanillin (4-hydroxy-3-  
 20 methoxybenzaldehyde), 4-vinylguaiacol (2-methoxy-4-vinylphenol) and sulfuric acid  
 21 (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Acetonitrile and  
 22 methanol were acquired from J. T. Baker (New Jersey, USA) and Merck (Darmstadt,

1 Germany), respectively, and were of HPLC grade. Sodium hydroxide, formic acid (85 %)  
2 and all other reagents purchased were of analytical grade from Neon (Suzano, São Paulo,  
3 Brazil).

4

#### 5 **Yeast screening for ferulic acid biotransformation**

6 To evaluate the ability of strains to grow in a synthetic medium containing ferulic  
7 acid, cultures were pre-cultivated in liquid YM medium (1 % glucose, 0.5 % peptone, 0.3  
8 % yeast extract, 0, 3 % yeast extract) and incubated in a rotary shaker for approximately  
9 14 h at 30 °C and 120 rpm, until reaching optical density (OD) 1.0 at 600 nm. Then, 10  
10 % volume of cell suspension was transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 90  
11 mL of sterile YM medium and 0.8 g.L<sup>-1</sup> ferulic acid (dissolved in sodium hydroxide 0.5  
12 M and filter-sterilized). Flasks were kept under agitation at 120 rpm for 120 h and 30 °C.

13

#### 14 **Effect of initial pH in shake flask cultivations**

15 Investigating whether initial pH would affect bioconversion of ferulic acid or the  
16 pool of metabolites produced, experiments with selected yeasts were carried out in 500  
17 mL Erlenmeyer flasks containing 90 mL of YM medium added of 2 g.L<sup>-1</sup> ferulic acid  
18 filter-sterilized and 10 mL of cell suspension obtained as mentioned above. Before  
19 sterilization of YM medium, pH was adjusted to 5.0. A control experiment with no pH  
20 adjustment was also run (pH 6.51 ± 0.04). Bioconversions experiments were carried out  
21 for 72 h at pH 5.0 and 48 h in control experiments, at 30 °C and 120 rpm.

22

#### 23 **Effect of two-step fermentation**

24 In this experiment, induction of strains was tested to evaluate whether ferulic acid  
25 had influence on biomass formation or whether its addition at a later-stage would improve  
26 bioconversion. For that, selected strains were pre-cultured in YM medium to obtain a cell  
27 suspension of OD<sub>600nm</sub>1.0 and then 10 % (volume fraction) of this culture was transferred  
28 to an Erlenmeyer containing modified YM medium (2 % glucose, 0.5 % peptone, 0.3 %  
29 yeast extract, 0.3 % malt extract) and incubated at 120 rpm and 30 °C. Growth was  
30 followed by OD measurements at 600 nm in UV-spectrophotometer (SpectraMax Plus  
31 384, Molecular Devices, California, USA) until cultures reached stationary phase (~ 24  
32 h). Then, 2 g.L<sup>-1</sup> of ferulic acid filter-sterilized was added to medium and bioconversion

1 was carried for 72 h, at 120 rpm and 30 °C. No pH adjustments were made in this  
2 experiment, with initial pH ranging from 6.1 to 6.4 before ferulic acid addition.

3

#### 4 **Bioreactor cultivations**

5 From the results obtained in all experiments above, we selected the strain that  
6 showed the highest consumption of ferulic acid and further conversion to vanillic acid,  
7 vanillin and 4-vinlyguaiacol. Batch cultivations in a 2-L stirred-tank bioreactor (Biostat  
8 B, B. Braun Biotech International, Germany) were run to evaluate two different  
9 conditions of controlled pH (5.5 and 6.5) at 0.5 vvm and then, selecting the best pH, tested  
10 a higher aeration condition (2.5 vvm) to evaluate the effect of these parameters in  
11 biotransformation. A volume of 1.5 L of YM modified medium was used, inoculated with  
12 10 % (volume fraction) of cell suspension OD 1.0, and the cultivation conditions were  
13 300 rpm and 30 °C.

14

#### 15 **Ferulic acid decarboxylase (FDC) activity**

16 *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 cells were grown in YM medium until  
17 reaching an OD of 1.0; cells were then centrifuged (3,500 g, 15 min, 4° C) and  
18 resuspended in 70 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.1 g.L<sup>-1</sup> ferulic acid  
19 and incubated for 8 h at 30 °C, following methodology described by Kaur *et al.* [20].  
20 Samples were taken at each 2 h, centrifuged at 3,500 g for 15 min and FDC activity was  
21 determined by spectrophotometer in a UV range of 250 to 350 nm and HPLC was used  
22 to observe metabolites formation and quantification of 4-VG.

23

#### 24 **Analytical determinations**

25 Samples were taken at predetermined intervals, centrifuged (3,500 g, 15 min, 4  
26 °C) and the supernatant was collected and kept at – 20 °C until HPLC analysis. A  
27 Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC equipment equipped with a quaternary pump (LC-  
28 20AD) was used for chromatographic analysis.

29 Glucose was quantified using a refractive index (RI) detector and an Aminex 87H  
30 column (9 µm, 300 x 7.8 mm, Bio-Rad, United States) with sulfuric acid 5 mM as eluent.  
31 An isocratic flow rate of 0.6 mL.min<sup>-1</sup> and temperature of 45 °C was used. Phenolic

1 compounds were separated in a Shimpack CLC- ODS C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm,  
2 Shimadzu, Japan) with a diode array detector (DAD) at a flow rate of 0.9  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and  
3 column temperature at 29  $^{\circ}\text{C}$ , using a mobile phase with water/formic acid (99.5:0.5, v/v)  
4 (solvent A) and acetonitrile/formic acid (99.5:0.5, v/v) (solvent B) in a linear gradient  
5 from A/B 99:1 to 50:50 in 50 min; 50:50 to 1:99 in 5 min, following methodology  
6 described by Rodrigues *et al.* [21]. The latter ratio (1:99) was maintained for additional 5  
7 min. The UV-vis spectra were obtained between 200 and 600 nm and the chromatograms  
8 were processed at 280 and 323 nm.

9 Biomass concentration was gravimetrically determined during cultivations where  
10 samples were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membranes, dried by infrared heating (Ohaus MB-  
11 35, Parsippany, NJ) and weighted. The pH determinations were made during flask  
12 experiments using a digital pHmeter (Kasvi, Paraná, Brazil).

13

#### 14 **Kinetic parameters and statistical analysis**

15 Consumption of sugars and FA were determined by Equation 1 and expressed as  
16 percentages.

$$Consumption (\%) = \frac{S}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

17 Where  $S_0$  is the initial substrate concentration ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $S$  is the final substrate  
18 concentration ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) at each interval. VA and 4-VG conversion yields ( $Y_{\text{VA/FA}}$ ,  $Y_{4\text{-VG/FA}}$ ,  
19  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) were defined as the ratio of maximum metabolite concentration produced and  
20 ferulic acid consumed at the chosen interval. Productivity ( $Q_P$ ,  $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ , where  $P$  is the  
21 product obtained) was determined by the ratio between maximum concentration of VA  
22 and 4-VG observed and the cultivation time to reach them.

23 The statistics of experimental data were analyzed by Tukey's test using the  
24 software Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA), at a significance level of 0.05. Except  
25 preliminary screening, all experiments were run in duplicates and data plotted as the mean  
26 deviation of experimental points.

27

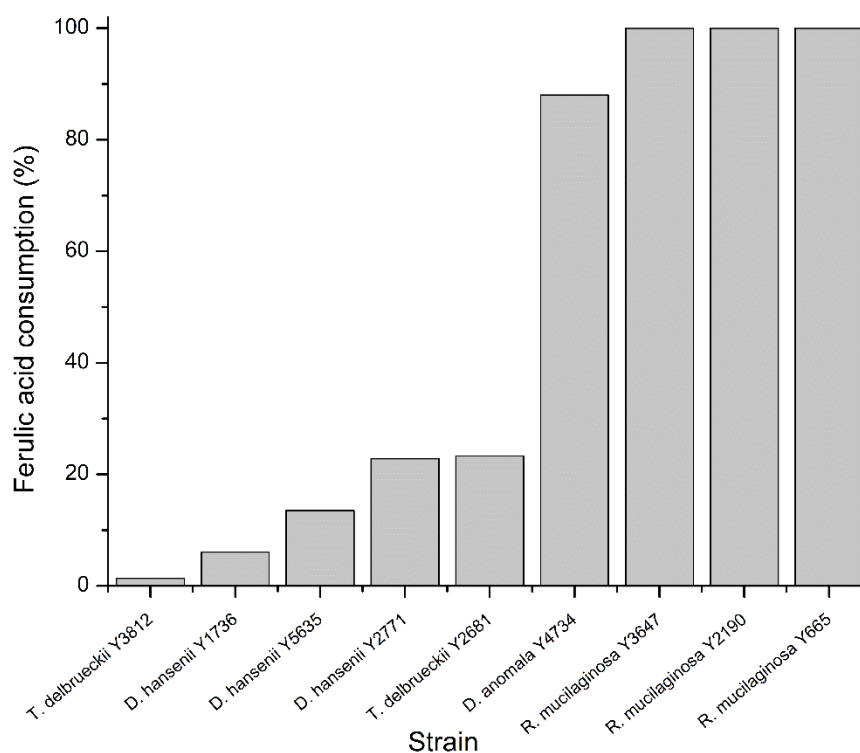
## 1 RESULTS AND DISCUSSION

2

### 3 Screening of yeast strains for biotransformation of ferulic acid

4 When studying the ability of strains to metabolize ferulic acid, we tested two  
5 different approaches in terms of carbon source: using 10 g.L<sup>-1</sup> of glucose, in a standard  
6 YM medium (data not shown), or 2 g.L<sup>-1</sup> glucose, aiming to reduce cultivation time as  
7 enzymes involved in FA catabolism are described as substrate inducible [22–24].

8 Consumption of FA in medium containing 2 g.L<sup>-1</sup> glucose is shown in Figure 1,  
9 and of the nine isolated yeasts tested, eight (88 %) were able to metabolize ferulic acid at  
10 some level. For the three strains of *Debaryomyces hansenii* (UFMG-CM-Y1736, UFMG-  
11 CM-Y5635, UFMG-CM-Y2771) and *Torulaspora delbrueckii* UFMG-CM-Y2681,  
12 consumption ranged from 6.06 to 23.29 %, however, no detection of aromatic compounds  
13 (VA, V, or 4-VG) were found in culture media. The strain *T. delbrueckii* UFMG-CM-  
14 Y3812 demonstrated poor ability to metabolize FA (< 2 %) in the screening tests, thus it  
15 was discarded. Hernández-Orte *et al.* [25] observed the production of very low amounts  
16 of V and VA in a wine synthetic medium for the cultivation of *T. delbrueckii*. This yeast  
17 strain is often described as a low-producer of volatile phenol compounds [26].



18

19 Figure 8. Consumption (%) of 0.8 g.L<sup>-1</sup> ferulic acid by yeasts in preliminary screening.



1            *Dekkera anomala* UFMG-CM-Y3474 showed high assimilation of ferulic acid  
2 (almost 90 %), but it did not produce VA or V. Instead, it produced good amounts of 4-  
3 vinylguaiacol (530.81 mg.L<sup>-1</sup>). *D. anomala* are commonly described as spoilage yeasts,  
4 especially in wines and beers, and are responsible for the formation of off flavors such as  
5 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol derived from phenolic compounds (POFs, phenolic  
6 off flavors), which are  $\rho$ -coumaric acid and ferulic acid, respectively [16]. The conversion  
7 of ferulic acid to 4-VG is mainly due to ferulic acid decarboxylase activity (FDC), through  
8 a non-oxidative decarboxylation route, resulting in the formation of hydroxystyrenes,  
9 with “smoky” and “spicy” flavors [27].

10            Under both glucose concentrations tested, the three strains of *Rhodotorula*  
11 *mucilaginosa* consumed all the ferulic acid present in culture medium, with low detection  
12 of vanillic acid for *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y665 (< 30 mg.L<sup>-1</sup>), and concentrations  
13 of 48.26 mg.L<sup>-1</sup> and 130.51 mg.L<sup>-1</sup> for *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 and UFMG-  
14 CM-Y2190, respectively.

15            *Rhodotorula* is a genera of oleaginous yeasts, known for its application in fatty  
16 acids production and its ability to produce carotenoids, with red and orange pigments  
17 [28]. Phenolic compounds metabolism in *Rhodotorula* yeasts is poorly described in  
18 literature, but *R. mucilaginosa* (former *R. rubra*) was already found to be able to produce  
19 vanillic acid, vanillin and guaiacol by ferulic acid bioconversion [29], specially through  
20  $\beta$ -oxidation and decarboxylation mechanisms, as reported for *R. minuta* and *R. glutinis*  
21 isolated from fruit juices [30,31].

### 22 23 **Influence of pH in *R. mucilaginosa* strains**

24            As it is well known, pH conditions have strong influence on bioconversion  
25 experiments hence microorganisms can only grow in a narrow range of pH, directly  
26 affecting products yields ( $Y_{P/S}$ ). Therefore, *R. mucilaginosa* strains were grown in a  
27 medium with 2 g.L<sup>-1</sup> FA and initial pH of 5.0 and 6.5 (control). The results for maximum  
28 VA, 4-VG concentration and yields ( $Y_{P/S}$ ) are shown in Table 2. Vanillin was produced  
29 in trace amounts in all experiments, in concentrations of approximately 10 mg.L<sup>-1</sup>.

30            At initial pH 5 (Figure 2), we observed that VA production was higher than control  
31 experiment, being UFMG-CM-Y2190 and UFMG-CM-Y3647 the best producers ( $1.25$   
32  $\pm 0.03$  g.L<sup>-1</sup> and  $1.14 \pm 0.02$ , respectively). UFMG-CM-Y665 showed highest levels of  
33 4-VG production under both pH conditions ( $0.35 \pm 0.01$  g.L<sup>-1</sup> and  $0.79 \pm 0.08$ ,

- 1 respectively) being the major pathway of this strain possibly followed by non-oxidative
- 2 decarboxylation, such as *Aspergillus niger* [32] and *Candida lambica* [31].

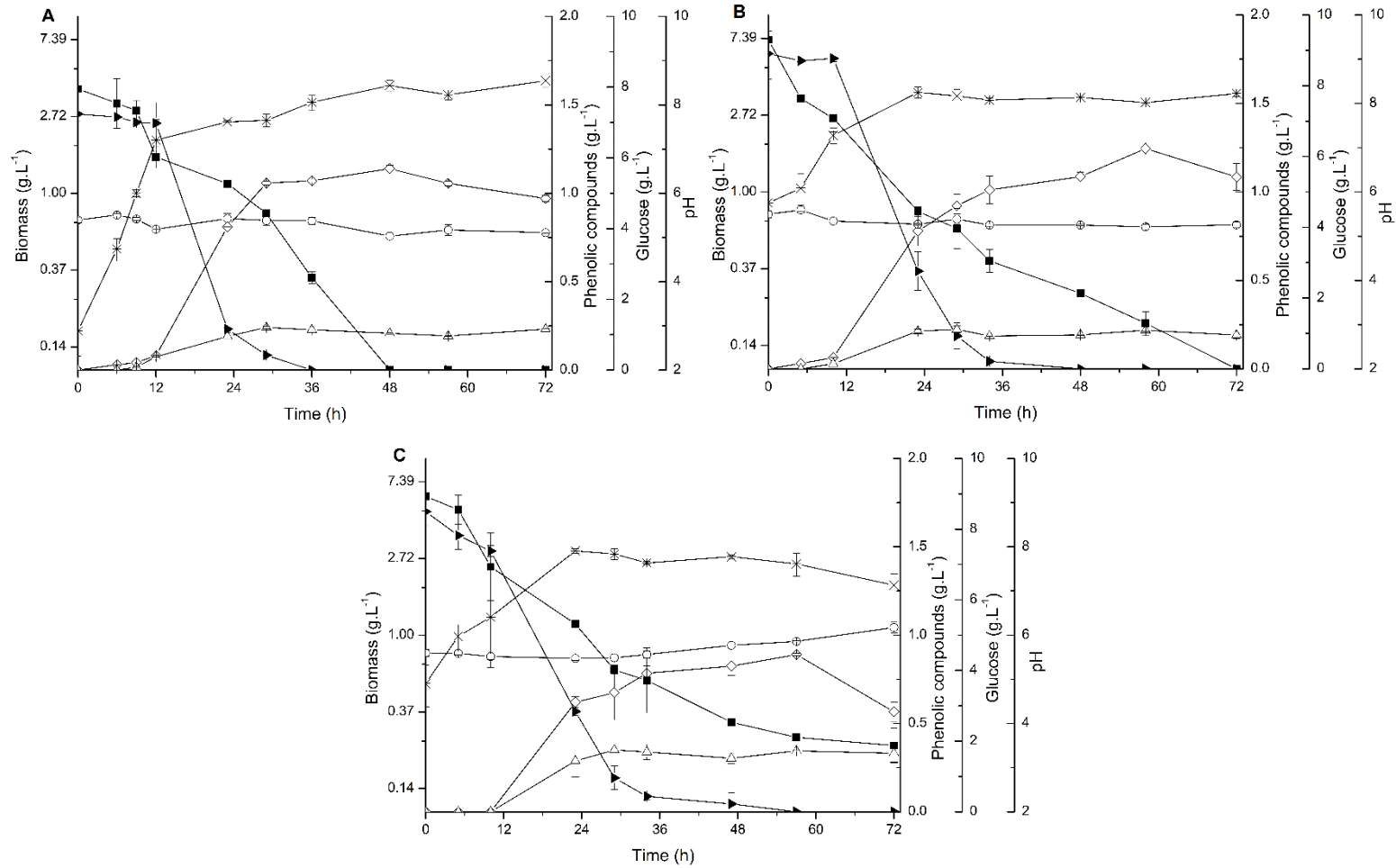


Figure 9. Biotransformation of 2 g.L<sup>-1</sup> FA at initial pH 5.0 in *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 (A), UFMG-CM-Y2190 (B) and UFMG-CM-Y665 (C). (○) pH, (\*) biomass (▴) ferulic acid, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol.

1 Metabolism differences between the strains were noticed mainly in terms of yields  
2 and volumetric productivity, where UFMG-CM-Y3647 demonstrated improved results  
3 as FA was completely metabolized in 36 h, compared to 48 h for UFMG-CM-Y2190 and  
4 UFMG-CM-Y665. Moreover, UFMG-CM-Y3647 showed the highest biomass  
5 concentration after 48 h ( $4.43 \pm 0.24 \text{ g.L}^{-1}$ ), when all glucose was depleted whereas  
6 UFMG-CM-Y2190 produced  $2.14 \pm 0.04 \text{ g.L}^{-1}$  at the same time, achieving  $3.70 \pm 0.19$   
7  $\text{g.L}^{-1}$  of biomass after 72 h of cultivation.

8 Although differences in concentrations of metabolites produced in culture  
9 medium, we observed that after exhaustion of FA and maximum VA formation, the three  
10 strains started to consume VA but not 4-VG, as the concentration of the latter metabolite  
11 remained constant. Degradation of VA can result in the formation of: a) vanillin or  
12 vanillyl alcohol by reductive metabolism; b) guaiacol by decarboxylation, in a reaction  
13 similar to catalyzed by FDC; and c) methoxyhydroquinone by oxidant decarboxylation  
14 of substrate, as observed in *Pycnoporus cinnabarinus* metabolism [33]. The presence of  
15 V in trace amounts under both pH conditions could also indicate the transient formation  
16 of metabolite, being V an intermediate of VA formation, similar to what occurs in  
17 *Streptomyces sannanensis* [34] and *S. halstedii* [35], as vanillin toxicity diminish the  
18 ability of certain microorganisms to accumulate it [36].

19 In the control experiments (pH 6.5), presented in Figure 3, we observed that FA  
20 was not completely consumed by any of the three strains after 48 h, ranging from 67 %  
21 for UFMG-CMG-Y2190 to 93 % for UFMG-CM-Y665. VA production was significantly  
22 smaller in control experiments, indicating that in acidic conditions (pH < 6), VA  
23 conversion by *R. mucilaginosa* is more efficient.

24 Thus, we observed a very different behavior over pH range in both experiments,  
25 as at initial pH 5.0 no significant changes were noticed, except for a slight decrease at the  
26 first 12 h ( $5.33 \pm 0.14$ ) in all three strains. Final pH varied from  $5.11 \pm 0.01$  in UFMG-  
27 CM-Y3647 to  $6.18 \pm 0.12$  in UFMG-CM-Y665. When comparing to control experiments,  
28 same decrease was observed at first 12 h of cultivation, but final pH increased notably in  
29 all strains, specially UFMG-CM-Y665, with final pH of  $7.30 \pm 0.08$ .

30 This could be a consequence of the depletion of FA and higher 4-VG presence in  
31 culture medium, as this compound is described as a weak base [37], with pKa 10.03,  
32 whereas at higher VA concentrations (pKa 4.53) pH stabilized [38]. The increase in pH  
33 may have also affected FA degradation, as it can be observed by a sharp decrease of FA

1 consumption rate at 48 h, indicating that possibly key role enzymes in ferulic acid  
2 catabolism could have been affected, lowering the bioconversion.

3         Concerning 4-VG formation in control experiments, UFMG-CM-Y665 was once  
4 again the highest producer strain, achieving  $0.79 \pm 0.08 \text{ g.L}^{-1}$  after 48 h, reaching a  $Q_{4\text{-VG}}$   
5 of  $16.45 \pm 1.68 \text{ mg.}(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ . VA production was almost two-fold lower than for cultures at  
6 pH 5.0, UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y2190 producing the highest concentrations  
7 ( $0.73 \pm 0.09 \text{ g.L}^{-1}$  and  $0.69 \pm 0.14$ ), corresponding to an average molar yield of  
8 approximately 55 %. These results are similar to those observed by Zheng *et al.* [39] in  
9 reporting the bioconversion of ferulic acid extracted from waste residue of rice bran in  
10 cultures of *Aspergillus niger*. In this study, the effect of FA initial concentration was  
11 evaluated, in which cultures with  $4 \text{ g.L}^{-1}$  of FA produced a molar yield of 57.7 % after 72  
12 h.

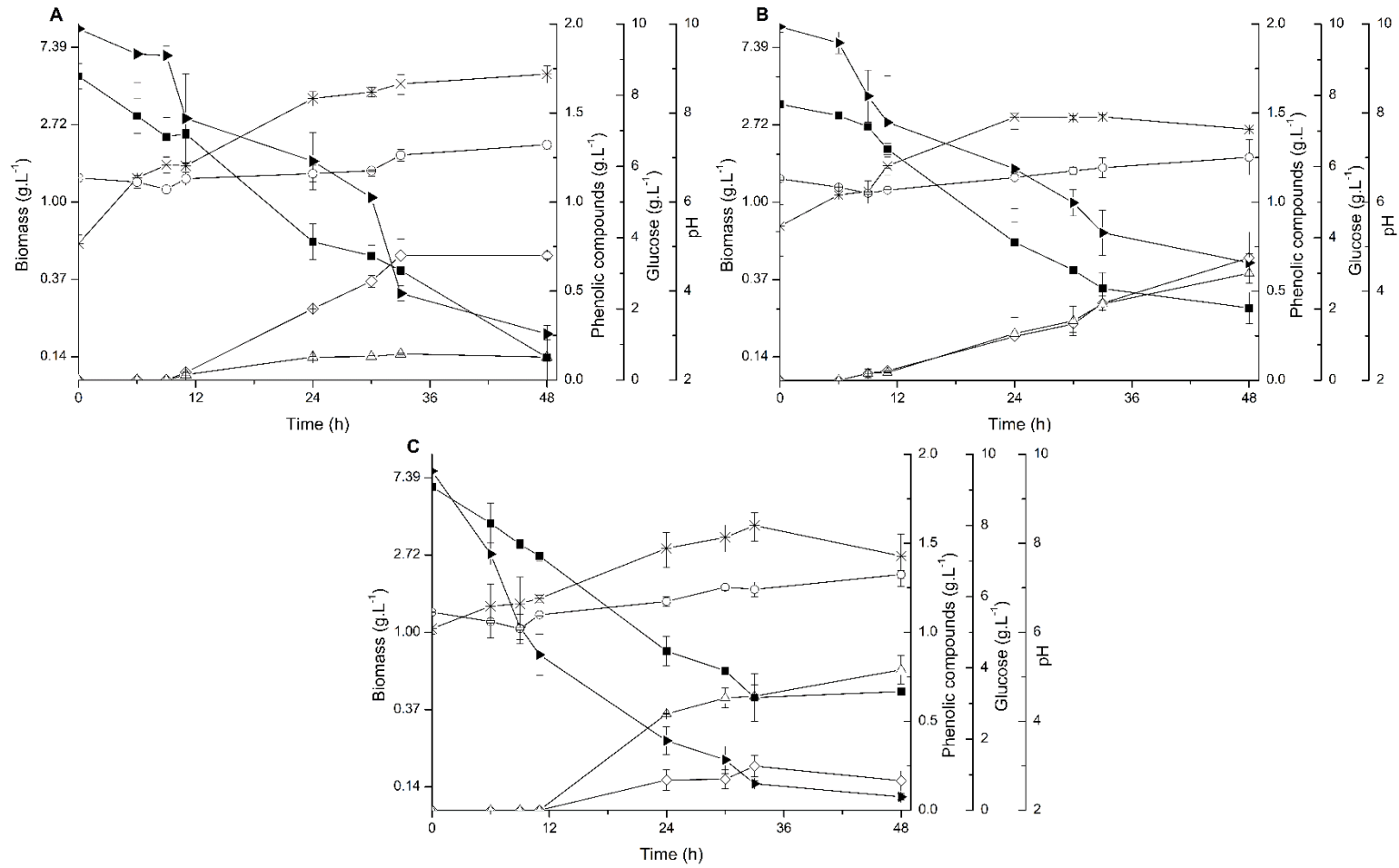
13         It should be noticed that VA maximum concentration was achieved at 48 h in  
14 cultures of UFMG-CM-Y3647, with a significant accumulation between 30 and 33 h of  
15 cultivation (Fig. 3A), where strain was entering stationary phase (late exponential phase).  
16 This increase in VA production rate suggests that FA degradation and, therefore, its  
17 conversion, is improved in *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 at this growth stage, as  
18 an adaptation period may be required under these conditions. Similar patterns were  
19 observed for *Amycolatopsis sp.* cultures where FA was quickly converted after 24 to 30  
20 h of cultivation, at the exponential phase [40].

1 Table 2. Kinetics parameters observed in pH 5 and control experiments.

Condition	Strain	VA max. (g.L <sup>-1</sup> )	4-VG max. (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>VA/FA</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>4-VG/FA</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Q <sub>VA/FA</sub> (mg.(L·h) <sup>-1</sup> )	Q <sub>4-VG/FA</sub> (mg.(L·h) <sup>-1</sup> )
pH 5	UFMG-CM-Y3647	1.14 ± 0.02 <sup>ab1</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>cd3</sup>	0.77 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.00 <sup>bc</sup>	23.73 ± 0.40 <sup>a</sup>	8.31 ± 0.21 <sup>c</sup>
	UFMG-CM-Y2190	1.25 ± 0.03 <sup>ab2</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>cd3</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>cd</sup>	21.47 ± 0.57 <sup>ab</sup>	7.70 ± 0.69 <sup>c</sup>
	UFMG-CM-Y665	0.89 ± 0.01 <sup>bc2</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>c3</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>abc</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>b</sup>	15.35 ± 0.10 <sup>bc</sup>	12.04 ± 0.30 <sup>b</sup>
Control (pH 6.5)	UFMG-CM-Y3647	0.73 ± 0.09 <sup>c1</sup>	0.15 ± 0.00 <sup>d4</sup>	0.43 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>d</sup>	15.27 ± 1.93 <sup>bc</sup>	4.46 ± 0.12 <sup>d</sup>
	UFMG-CM-Y2190	0.69 ± 0.14 <sup>c1</sup>	0.60 ± 0.03 <sup>b1</sup>	0.52 ± 0.11 <sup>bc</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>a</sup>	14.33 ± 3.00 <sup>c</sup>	12.52 ± 0.64 <sup>b</sup>
	UFMG-CM-Y665	0.25 ± 0.08 <sup>d1</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>a1</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.18 ± 1.24 <sup>d</sup>	16.45 ± 1.68 <sup>a</sup>

2 Mean values ± standard deviation (*n* = 2)3 <sup>1</sup> After 48 h of cultivation.4 <sup>2</sup> After 58 h of cultivation.5 <sup>3</sup> After 29 h of cultivation.6 <sup>4</sup> After 33 h of cultivation.7 Different letters overlapped in the same column indicate significant statistical difference (*p* < 0.05).

8



1

2

3 Figure 10. Biotransformation of 2 g.L<sup>-1</sup> FA in control experiments (pH 6.5) in *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 (A), UFMG-CM-Y2190 (B)  
 4 and UFMG-CM-Y665 (C). (○) pH, (\*) biomass, (■) glucose, (▶) ferulic acid, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Plots represent the  
 5 mean of duplicates.

## 1 **Two-step process to improve VA and V production**

2 A two-step process was designed to investigate the influence of initial biomass  
3 concentration on FA bioconversion. Cells were grown in 20 g.L<sup>-1</sup> glucose until reaching  
4 stationary phase, 24 h for UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y2190, and 25 h for  
5 UFMG-CM-Y665, then FA was added to culture medium at a final concentration of 2  
6 g.L<sup>-1</sup>. Kinetic results are shown in Figure 4.

7 This approach was previously evaluated for *Sporotrichum thermophile* [41] and  
8 *Debaryomyces hansenii* [18], as glucose concentration appears to have a strong effect  
9 over ferulic acid uptake [42].

10 In our experiments, UFMG-CM-Y2190 consumed all FA present in culture  
11 medium after 72 h of the addition, whereas UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y665  
12 consumed 73 and 94 %, respectively. In contrast with reports by Max *et al.* [42], where  
13 glucose showed negative effect on FA consumption and on the 4-vinylguaiacol formation  
14 by *D. hansenii*, in our experiments glucose concentration enhanced 4-VG formation for  
15 UFMG-CM-Y3647 and UFMG-CM-Y2190, whereas the same effect was not observed  
16 for VA production. Strain UFMG-CM-Y2190 produced a maximum of 1.63 ± 0.09 g.L<sup>-1</sup>  
17 of 4-VG after 55 h, reaching a Q<sub>4-VG</sub> of 29.59 ± 1.55 mg.(L·h)<sup>-1</sup>, an increase of almost 3  
18 times compared to the control experiment.

19 *D. hansenii* produced 1.23 g.L<sup>-1</sup> of 4-VG from 2 g.L<sup>-1</sup> of FA after 48 h, when  
20 cultivated in 1 g.L<sup>-1</sup> glucose, whereas FA catabolism was found to be repressed in higher  
21 glucose concentrations and therefore accumulation of 4-VG was affected [42].  
22 Nevertheless, the authors stated that glucose and nitrogen concentrations helped to  
23 redirect the metabolism of *D. hansenii*, the same pattern observed in our work.

24 As it can be observed in Figure 4B, between 60 h and 72 h of total cultivation time  
25 (33 h and 48 h after FA addition), 4-VG production almost doubled, followed by an  
26 increase in pH from 6.82 to 7.26, confirming the hypothesis that pH increase is likely due  
27 to 4-VG accumulation. For UFMG-CM-Y665, where higher concentrations of 4-VG were  
28 achieved in the previous experiments, glucose concentrations seemed to have negative  
29 impact on 4-VG formation, but no effect on FA consumption, as consumption percentage  
30 were similar to observed in the control experiment. Only 0.64 ± 0.10 g.L<sup>-1</sup> of 4-VG was  
31 produced, followed by a final production of 0.49 ± 0.03 g.L<sup>-1</sup> of VA.

32 In Fig. 4C, it is possible to observe that during the first 60 h of cultivation, similar  
33 concentrations of the metabolites were produced by the strain, and enhanced production



1 of 4-VG was reached after 70 h, in parallel to faster degradation rate of FA. This behavior  
 2 was already observed by Baqueiro-Peña *et al.* [32] when investigating FA  
 3 biotransformation by a diploid strain of *A. niger*, where high 4-VG formation rate  
 4 occurred between 72 h and 108 h, with 64 % of FA consumption after 120 h.

5 Biomass was not significantly enhanced by this approach, in comparison with  
 6 initial pH treatment and control, whilst after reaching stationary phase all cultivations still  
 7 had some unconsumed glucose, with 24 % remaining for UFMG-CM-Y665, 50 % for  
 8 UFMG-CM-Y2190 and 53 % for UFMG-CM-Y3647. Hence, UFMG-CM-Y2190, the  
 9 only strain that consumed all FA, reaching a maximum of  $4.77 \pm 0.00 \text{ g.L}^{-1}$  of biomass,  
 10 suggesting that in this condition, FA consumption has no influence on biomass formation,  
 11 being glucose the only carbon source responsible for it.

12

13 Table 3. Yields ( $Y_{P/S}$ , g product.g<sup>-1</sup> substrate) and volumetric productivity ( $Q_P$ , mg.(L.h)<sup>-1</sup>)  
 14 for two-step process and control experiments.

Condition	Strain	$Y_{VA/FA}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{4-VG/FA}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$Q_{VA/FA}$ (mg.(L.h) <sup>-1</sup> )	$Q_{4-VG/FA}$ (mg.(L.h) <sup>-1</sup> )
Two-step cultivation	UFMG-CM-Y3647	$0.50 \pm 0.17^a$	$0.48 \pm 0.15^b$	$10.39 \pm 0.10^{abc2}$	$8.38 \pm 0.42^{cd3}$
	UFMG-CM-Y2190	$0.30 \pm 0.05^a$	$0.83 \pm 0.06^a$	$12.16 \pm 2.42^{abc1}$	$29.59 \pm 1.55^{a2}$
	UFMG-CM-Y665	$0.37 \pm 0.10^a$	$0.49 \pm 0.05^b$	$7.48 \pm 1.46^{bc2}$	$9.12 \pm 1.36^{c3}$
Control (pH 6.5)	UFMG-CM-Y3647	$0.43 \pm 0.07^a$	$0.08 \pm 0.01^c$	$15.27 \pm 1.93^{a1}$	$4.46 \pm 0.12^{d4}$
	UFMG-CM-Y2190	$0.52 \pm 0.11^a$	$0.45 \pm 0.02^a$	$14.33 \pm 3.00^{ab1}$	$12.52 \pm 0.64^{bc1}$
	UFMG-CM-Y665	$0.14 \pm 0.03^a$	$0.43 \pm 0.04^a$	$5.18 \pm 1.24^{c1}$	$16.45 \pm 1.68^{b1}$

15 Mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$ )

16 <sup>1</sup> After 48 h of cultivation.

17 <sup>2</sup> After 55 h of cultivation.

18 <sup>3</sup> After 70 h of cultivation.

19 <sup>4</sup> After 33 h of cultivation.

20 Different letters overlapped in the same column indicate significant statistical difference ( $p < 0.05$ ).

21

22 As for VA production, two-step process did not improve significantly its  
 23 production or yields when compared to control experiment (Table 3). UFMG-CM-Y3647  
 24 and UFMG-CM-Y2190 produced the highest concentrations ( $0.59 \pm 0.02 \text{ g.L}^{-1}$  and  $0.59$   
 25  $\pm 0.10 \text{ g.L}^{-1}$ , respectively) at 48 h, but these were approximately 19 % lower compared to  
 26 the control. UFMG-CM-Y3647 produced final VA concentration of  $0.57 \pm 0.01 \text{ g.L}^{-1}$  and

1  $0.59 \pm 0.03 \text{ g.L}^{-1}$  for 4-VG after 70 h, a  $Q_{VA}$  of  $10.39 \pm 0.10 \text{ mg.}(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ , which is almost  
2 2.5-times higher than value found in the control experiment.

3         Similar to observed in the control experiments, pH increased steadily over 72 h  
4 due to 4-VG accumulation. When pH reached neutrality ( $\sim 7.0$ ), a decrease in FA  
5 consumption rate was again observed for all three strains, supporting the hypothesis that  
6 key enzymes for FA degradation in *R. mucilaginosa* have its optimal conditions under  
7 lower pH ranges (between 5.0 and 6.0), in contrast to findings of Paz *et al.* [43] who  
8 studied the biotransformation of FA by *Bacillus aryabhatai* showing that FA  
9 consumption stopped for pH below 5, being optimum at pH 8.5. *Pediococcus acidilactici*,  
10 growing under optimized conditions for vanillin production using rice bran as ferulic acid  
11 source, produced  $1.27 \text{ g.L}^{-1}$  of the aroma at pH lower than 5.6 [44].

12         The results obtained in this set of experiments suggest that FA effective  
13 conversion by *R. mucilaginosa* is strictly dependent on pH range, with pH above 6  
14 slowing up yeasts metabolism, and acid culture media favoring VA production over 4-  
15 VG accumulation. Effect of pH in bioconversion of FA was already studied for some  
16 microorganisms [43–45] as this parameter shows great impact in intracellular reactions  
17 involving oxidation and reduction of phenolic compounds due to pKa differences.

18         Carbon sources are often added to cultures in FA bioconversion as an energy  
19 source for microorganism, but can also act as a precursor of vanillin by recombinant  
20 strains [46]. In this study, higher glucose concentration and latter addition of FA did not  
21 improved VA concentration nor its kinetics parameters. Nevertheless, sugar consumption  
22 had a strong impact in the pool of metabolites produced, and 4-VG concentration was  
23 enhanced for most strains when glucose concentration was higher. Under the conditions  
24 of this study, this is one of the few studies in which simultaneous 4-VG and VA  
25 production occurs in similar concentrations, since most microorganisms will produce a  
26 single metabolite.

27

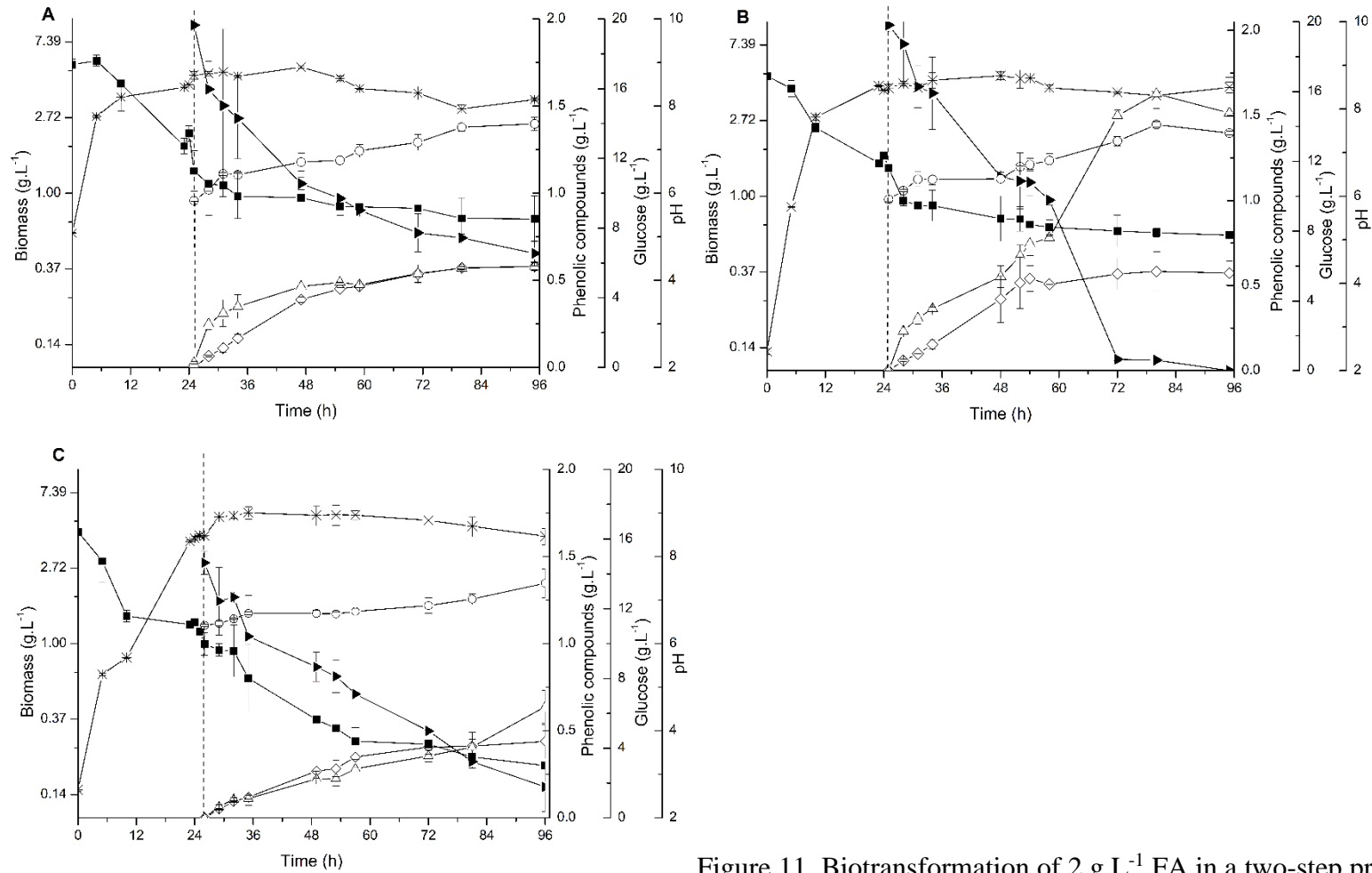


Figure 11. Biotransformation of 2 g.L<sup>-1</sup> FA in a two-step process by *R. mucilaginosa*

UFMG-CM-Y3647 (A), UFMG-CM-Y2190 (B) and UFMG-CM-Y665 (C). (○) pH, (\*) biomass (▶) ferulic acid, (■) glucose, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Dashed line marks FA addition to culture medium. Plots represent the mean of duplicates.

## 1 **Batch production of VA and 4-VG with varying aeration and pH conditions**

2 Based on the previous results, we selected the strain *R. mucilaginosa* UFMG-CM-  
3 Y3647 for tests in the bioreactor because of its ability to metabolize FA faster than the  
4 other strains. For that, pH control was set to either 5.5 or 6.5 in order to prevent variations  
5 in pH caused by 4-VG accumulation in culture medium.

6 Figure 5A shows the biotransformation of 2 g.L<sup>-1</sup> FA at pH 5.5 during 72 h.  
7 Similar kinetic patterns of shake flasks experiments were observed. Between 12 h and 24  
8 h there was an acceleration of FA degradation rate (up to 77.47 ± 3.30 mg.(L·h)<sup>-1</sup>), with  
9 enhanced formation of VA. In contrast with experiments where pH could not be  
10 controlled, 4-VG was produced in negligible amounts (0.04 g.L<sup>-1</sup> at 30 h).

11 At 33 h, maximum VA concentration of 1.20 ± 0.12 g.L<sup>-1</sup> was observed for  
12 residual FA of 0.06 g.L<sup>-1</sup>. At this stage, biomass concentration was of 5.77 ± 0.85 g.L<sup>-1</sup>  
13 and glucose was still not entirely consumed (3.80 ± 0.06 g.L<sup>-1</sup>). This concentration  
14 corresponds to a molar yield of 79 %, similar to observed for *Streptomyces halstedii*, 80  
15 % molar yield after 20 h in cultures with 1 g.L<sup>-1</sup> of FA [35].

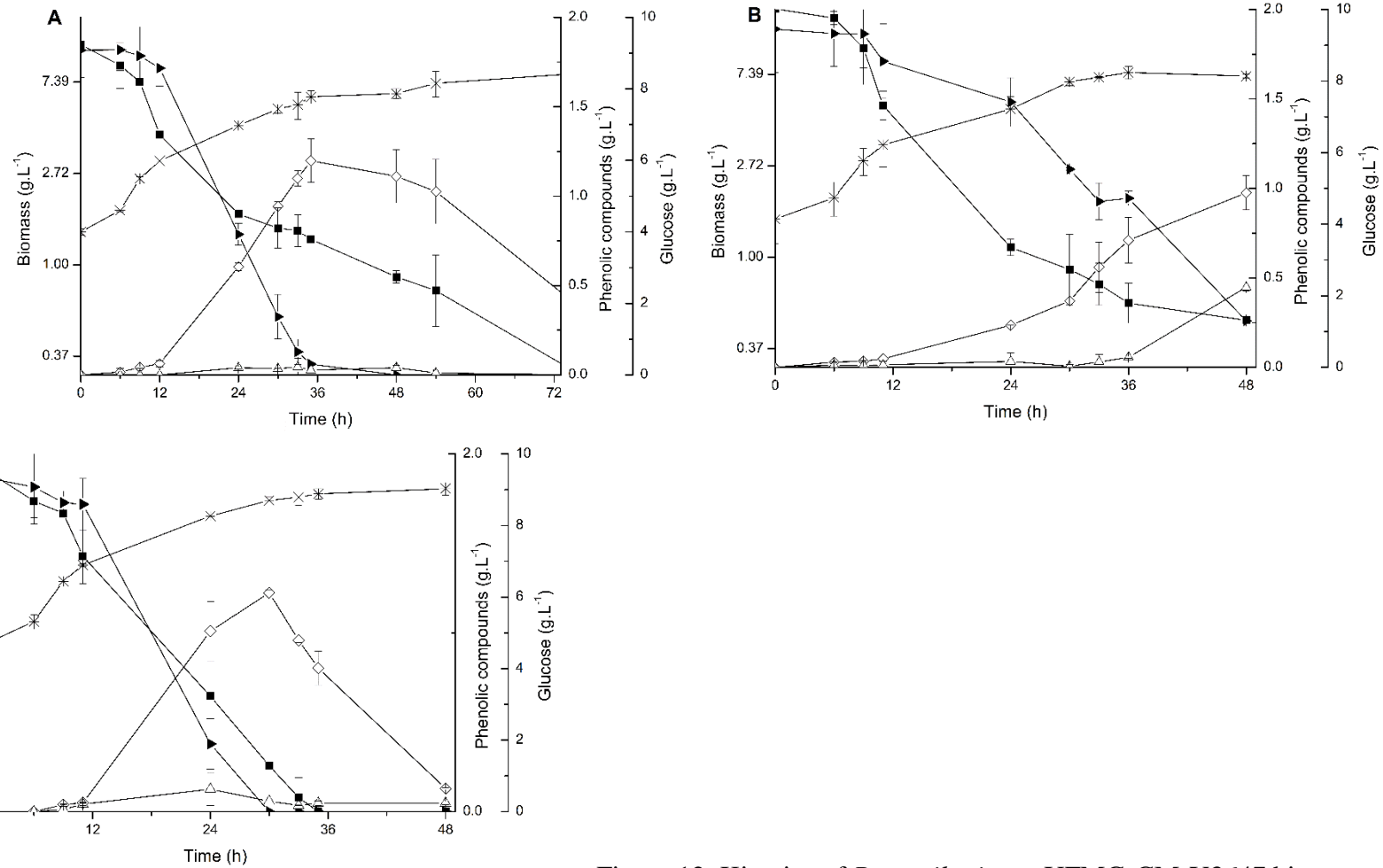
16 The suppression of 4-VG production and enhanced concentration of VA at 0.5  
17 vvm and pH 5.5 suggest that, under these conditions, decarboxylase activity could have  
18 been repressed and metabolism of *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 may had  
19 undergone a different pathway, probably by β-oxidation, with the formation of VA as  
20 major metabolite, as already described by Huang [29] for *R. mucilaginosa* and for other  
21 microorganisms such as *Pseudomonas fluorescens* AN103 [47] and *Acinetobacter*  
22 *calcoaceticus* [24]. The diauxic growth observed after 48 h from the consumption of  
23 aromatic compounds, in our case VA, was already related for some microorganisms [48–  
24 50], including *Rhodotorula graminis* [51,52], because of the presence of hydroxylases  
25 and dioxygenases that favor β-ketoadipate pathway.

26 In Figure 5B is presented the kinetics of cultivation of *R. mucilaginosa* UFMG-  
27 CM-Y3647 at pH 6.5. At this pH, FA consumption was negatively affected, with a  
28 degradation rate of 17.57 ± 5.51 mg.(L·h)<sup>-1</sup> between 12 h and 24 h, 4.4 times smaller than  
29 at pH set 5.5. In the first 24 h of cultivation VA was the major metabolite, with formation  
30 of 0.98 ± 0.10 g.L<sup>-1</sup>, as 4-VG was produced in low amounts of approximately 0.03 mg.L<sup>-1</sup>.  
31 Enhanced catabolism of FA (degradation rate = 52.77 ± 3.53 mg.(L·h)<sup>-1</sup> occurred after 36  
32 h, at the late exponential phase growth, in a very similar behavior as control experiments  
33 in shake flasks (Fig. 3A). Despite the increased uptake of FA at this interval, in controlled

1 pH 6.5, *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 was unable to consume all substrate, with  
2 residual 14 % of the phenolic compound after 48 h.

3 Between 36 and 48 h, 4-VG accumulation was significantly improved, with a final  
4 concentration of  $0.45 \pm 0.02 \text{ g.L}^{-1}$  at 48 h, slightly higher than observed in *Candida*  
5 *lambica* [31] and *Enterobacter* sp. Px6-4 [53]. Table 4 shows the kinetic parameters of  
6 bioreactor experiments. Later-stage 4-VG production suggests that decarboxylase activity  
7 (FDC) in *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 could be affected not only by pH but also  
8 according to microorganism growth stage, as resting cells are commonly used to  
9 determine this enzymatic activity [18,20,22,31,54].

10 After pH definition, we tested a higher aeration condition in order to evaluate the  
11 effect of oxygen concentration on VA production. Results depicted in Figure 5C show  
12 that higher aeration rate did not improved VA concentration, as maximum metabolite  
13 production was  $1.20 \pm 0.02 \text{ g.L}^{-1}$  (78 % molar yield), similar to values obtained under  
14 lower aeration. Contrastingly, Torre *et al* [55] in experiments with *E. coli* JM109/pBB1  
15 observed that under excessive aerobic conditions (ratio of medium volume:flask volume  
16 = 0.2, agitation of 200 rpm) the VA concentration increased from  $9.2 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $18 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  
17 probably favoring a non-specific oxidase, catalyzing the oxidation of vanillin into vanillic  
18 acid.



1

2

3

4

Figure 12. Kinetics of *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 bioreactor cultivation in a 2-L bioreactor, with 2 g.L<sup>-1</sup> FA at 30 °C, 300 rpm and (A) 0.5 vvm air and pH set to 5.5, (B) 0.5 vvm air and pH set to 6.5 and (C) 2.5 vvm air and pH 5.5. (\*) biomass, (■) glucose, (►) ferulic acid, (◇) vanillic acid and (△) 4-vinylguaiacol. Plots represent the mean of duplicates.

Both biomass concentration and VA productivity, however, were significantly increased, with VA productivity of  $40.82 \pm 0.57 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , 19 % higher than for 0.5 vvm, while biomass final concentration increased from  $6.52 \pm 0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $10.27 \pm 0.71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Consumption of VA was again observed after 33 h, but 4-VG formation did not differ from previous experiments. In all bioreactor experiments, we observed that FA was completely depleted prior to glucose, similar to observed for *Pseudomonas putida* CSV86 [48], suggesting that *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 could grow properly in a medium with low glucose concentrations and medium to high concentrations of phenolic compounds, such as alkaline hydrolysates of lignocellulosic biomasses, for example, corn cobs [9], red oak [56] and brewer's spent grain [57].

Table 4. Yield, productivity and FA consumption (%) obtained by *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 in bioreactor experiments in different pH and aeration conditions, 30 °C and 300 rpm, after 48 h.

Condition	FA consumption (%)	$Y_{\text{VA/FA}} (\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	$Q_{\text{VA}} (\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1})$	$Y_{4\text{-VG/FA}} (\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	$Q_{4\text{-VG}} (\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1})$
0.5 vvm + pH 5.5	100 %	$0.66 \pm 0.01^{\text{a}}$	$34.22 \pm 3.48^{\text{b}}$	$0.02 \pm 0.00^{\text{b}}$	$1.17 \pm 0.00^{\text{c}}$
0.5 vvm + pH 6.5	86 %	$0.60 \pm 0.03^{\text{a}}$	$20.33 \pm 1.99^{\text{a}}$	$0.25 \pm 0.01^{\text{a}}$	$9.33 \pm 0.43^{\text{a}}$
2.5 vvm + pH 5.5	100 %	$0.68 \pm 0.09^{\text{a}}$	$40.82 \pm 0.57^{\text{b}}$	$0.04 \pm 0.01^{\text{b}}$	$2.70 \pm 0.16^{\text{b}}$

Mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 2$ )

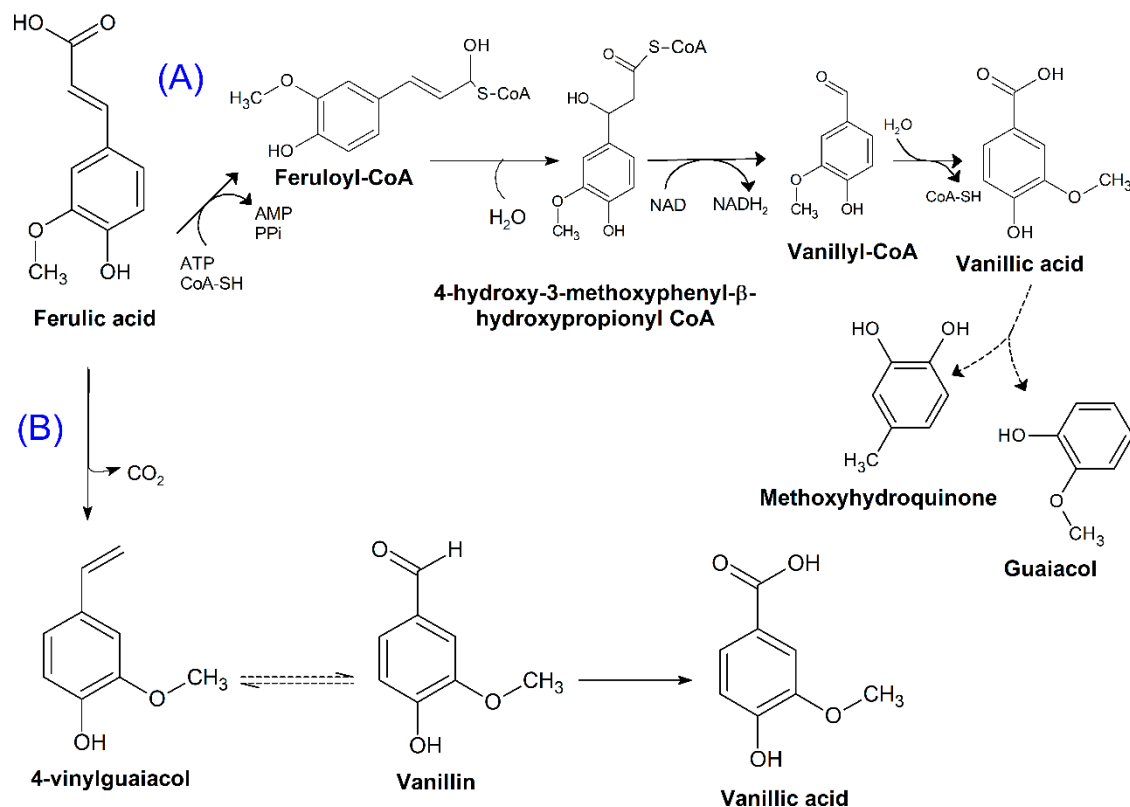
Different letters overlapped in the same column indicate significant statistical difference ( $p < 0.05$ ).

In this context, we proposed that FA metabolic pathway in *Rhodotorula mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 involves two different mechanisms (Figure 6), modulated by pH and aeration conditions. Under controlled acidic environments (a), *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 converts FA into VA as major metabolite, under  $\beta$ -oxidation, which initiates with the activation of FA to feruloyl-CoA, encoded by the enzyme feruloyl-CoA synthetase (FCS), and through sequential reactions is transformed into VA, which is further metabolized and probably converted to methoxyhydroquinone or guaiacol [58,59].

Under slightly neutral pH ranges (b), which could be free or controlled, FA undergoes non-oxidative decarboxylation, catalyzed by enzyme FDC, yielding VA and 4-VG as metabolites, whereas 4-VG could be the major metabolite depending on

1 bioconversion conditions, similarly to *Debaryomyces hansenii* [18,42], *Bacillus*  
 2 *licheniformis* [60], *Bacillus aryabhatai* [43] and other strains.

3



4

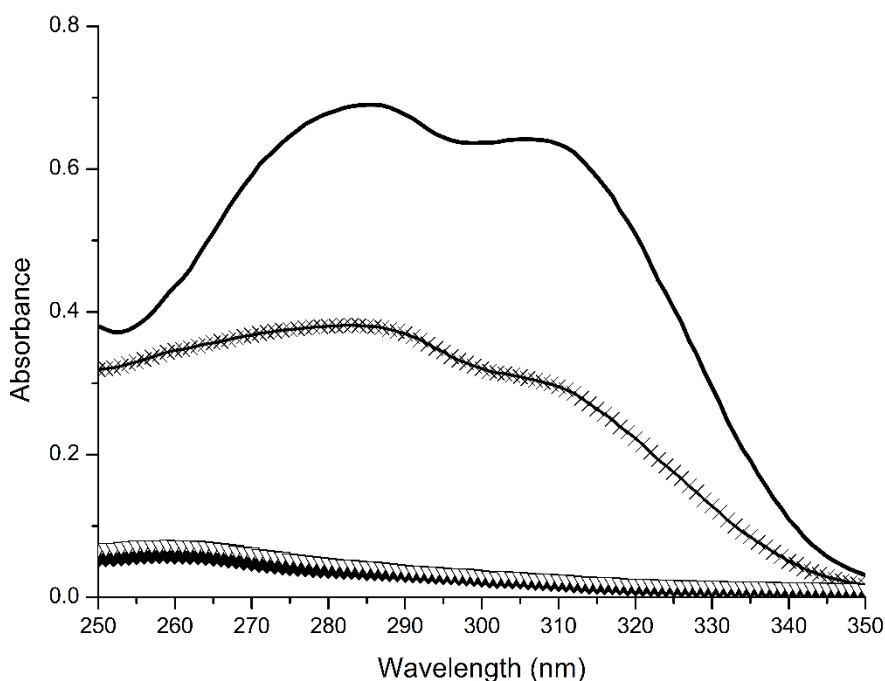
5 Figure 13. Metabolic pathway proposed for FA catabolism in *R. mucilaginosa* UFMG-  
 6 CM-Y3647.

### 7 Enzymatic decarboxylation of ferulic acid

8 Ferulic acid decarboxylase (EC 4.1.1.102) is the enzyme responsible for  
 9 catalyzing the initial step of non-oxidative decarboxylation, converting FA to 4-VG. This  
 10 mechanism was already reported for several microorganisms [18,32,43], including  
 11 *Rhodotorula* species [29,31].

12 We investigated the ability of *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 to  
 13 decarboxylate FA by monitoring UV changes in the absorbance and HPLC appearance  
 14 of 4-VG in samples, in order to elucidate the metabolic pathway FA proposed for this  
 15 strain. The UV-scans are shown in Figure 7.





1  
2 Figure 14. Changes in UV absorbance of 0.1 g.L<sup>-1</sup> FA by FDC activity of *R.*  
3 *mucilaginos*a UFMG-CM-Y3647. (—) 0 h, (×) 2 h, (◆) 4 h and (▽) 6 h.

4  
5 Decarboxylation of FA can be observed from the loss in peaks at 285 and 310 nm  
6 [61], whereas it can be observed that after 6 h FA was no longer present in detectable  
7 amounts in HPLC nor UV spectra.

8 Chromatograms (Figure S1 of Supplementary Material) showed the presence of  
9 4-VG, VA and a non-identified peak with absorption at 254 and 301 nm that, from  
10 literature comparison of UV spectrum [22,62] and similar studies of phenolic compounds  
11 metabolism [27,42], suggest the formation of 4-ethylguaiacol (4-EG), a phenolic  
12 compound with ‘spicy’ notes often described as off-flavor in wines and beers [63],  
13 through successive decarboxylation reactions. Further identification of the compound by  
14 LC-MS is, however, necessary.

15 The pH of enzymatic assay (pH 6.0) was selected based on previous studies  
16 [18,20], as characterization of FDC in *Rhodotorula* has not been clarified, therefore, the  
17 detection of simultaneous 4-VG and VA by HPLC is in agreement with our experiments,  
18 as pH conditions above 6.0 imply in concomitant production of metabolites.

19  
20

## 1 CONCLUSION

2 In this work, recently isolated yeast strains were investigated over their ability to  
3 grow on ferulic acid and convert it into value-added products such as vanillin, vanillic  
4 acid and 4-vinylguaiacol. Eight strains were able to grow in phenolic substrate, but only  
5 4 were capable of converting FA into flavor compounds (V, VA, and 4-VG). Effect of  
6 initial pH showed significant impact on FA degradation metabolism, as under acidic  
7 conditions VA production and its kinetics parameters were enhanced for all tested strains.  
8 Glucose concentration and late-stage addition of FA to medium influenced the pool of  
9 metabolites formed during FA catabolism, with 4-VG being the main product. In all  
10 conditions evaluated, V was detected in negligible amounts.

11 *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647, the strain consistently showing the best  
12 results, was cultivated in bioreactors, in the influence of pH and aeration were tested.  
13 Cultivations under pH 5.5 and 2.5 vvm produced the best results resulting in an average  
14 molar yield of 78 % of VA. This yeast strain might be tested over agro-industrial residues  
15 hydrolysates such as rice and oat husks, which are rich in FA content, as a promising  
16 alternative to obtain bioaromas through an eco-friendly approach.

17

## 18 Acknowledgments

19 This work was supported by grants from *Brazilian Coordenação de*  
20 *Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Finance Code 001); grants from  
21 *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), and from  
22 *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS).

23

1 **REFERENCES**

- 2 [1] M.A. Longo, M.A. Sanromán, Production of food aroma compounds: Microbial  
3 and enzymatic methodologies, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2006) 335–353.  
4 doi:http://doi.org/10.1201/9780429441837-15.
- 5 [2] L. Forti, S. Di Mauro, M.R. Cramarossa, S. Filippucci, B. Turchetti, P. Buzzini,  
6 Non-conventional yeasts whole cells as efficient biocatalysts for the production  
7 of flavors and fragrances, *Molecules.* 20 (2015) 10377–10398.  
8 doi:10.3390/molecules200610377.
- 9 [3] L. de O. Felipe, A.M. de Oliveira, J.L. Bicas, Bioaromas – Perspectives for  
10 sustainable development, *Trends Food Sci. Technol.* 62 (2017) 141–153.  
11 doi:10.1016/j.tifs.2017.02.005.
- 12 [4] A.P. Dionísio, G. Molina, D. Souza de Carvalho, R. Dos Santos, J.L. Bicas, G.M.  
13 Pastore, Natural flavourings from biotechnology for foods and beverages, 1st.,  
14 Woodhead Publishing Limited, Campinas, 2012. doi:doi.org/10.1016/B978-1-  
15 84569-811-9.50011-6.
- 16 [5] C.-T. Ho, Phenolic Compounds in Food, in: M. Huang, C.-T. Ho, C. Lee (Eds.),  
17 *Phytochemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, 1992: pp. 2–7.  
18 doi:doi.org/10.1021/bk-1992-0507.ch001.
- 19 [6] L. Bravo, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional  
20 significance, *Nutr. Rev.* 56 (2009) 317–333. doi:doi.org/10.1111/j.1753-  
21 4887.1998.tb01670.x.
- 22 [7] M. Naczek, F. Shahidi, Extraction and analysis of phenolics in food, J.  
23 *Chromatogr. A.* 1054 (2004) 95–111. doi:doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- 24 [8] N. Kumar, V. Pruthi, Potential applications of ferulic acid from natural sources,  
25 *Biotechnol. Reports.* 4 (2014) 86–93. doi:10.1016/j.btre.2014.09.002.
- 26 [9] P. Torre, B. Aliakbarian, B. Rivas, J.M. Domínguez, A. Converti, Release of  
27 ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis, *Biochem. Eng. J.* 40 (2008)  
28 500–506. doi:10.1016/j.bej.2008.02.005.
- 29 [10] N.J. Gallage, B.L. Møller, Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most  
30 popular plant flavor and its *de novo* biosynthesis in the vanilla orchid, *Mol. Plant.*  
31 8 (2015) 40–57. doi:10.1016/j.molp.2014.11.008.
- 32 [11] N.J. Walton, M.J. Mayer, A. Narbad, Vanillin, *Encycl. Toxicol.* Third Ed. 63  
33 (2014) 912–914. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00544-3.
- 34 [12] A.K. Sinha, U.K. Sharma, N. Sharma, A comprehensive review on vanilla flavor:  
35 Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents, *Int. J.*  
36 *Food Sci. Nutr.* 59 (2008) 299–326. doi:10.1080/09687630701539350.
- 37 [13] A. Dausch, G. Pastore, Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica,  
38 *Quim. Nova.* 28 (2005) 642–645. doi:10.1590/S0100-40422005000400017.
- 39 [14] P. Delaquis, K. Stanich, P. Toivonen, Effect of pH on the inhibition of *Listeria*  
40 spp. by vanillin and vanillic acid, *J. Food Prot.* 68 (2005) 1472–1476.  
41 doi:doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1472.

- 1 [15] J.A. Maga, I. Katz, Simple phenol and phenolic compounds in food flavor, C R C  
2 Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 10 (1978) 323–372.  
3 doi:doi.org/10.1080/10408397809527255.
- 4 [16] V. Harris, C.M. Ford, V. Jiranek, P.R. Grbin, *Dekkera* and *Brettanomyces* growth  
5 and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media, Appl. Microbiol.  
6 Biotechnol. 78 (2008) 997–1006. doi:10.1007/s00253-007-1328-7.
- 7 [17] B.D. Smith, B. Divol, The carbon consumption pattern of the spoilage yeast  
8 *Brettanomyces bruxellensis* in synthetic wine-like medium, Food Microbiol. 73  
9 (2018) 39–48. doi:10.1016/j.fm.2017.12.011.
- 10 [18] S. Mathew, T.E. Abraham, S. Sudheesh, Rapid conversion of ferulic acid to 4-  
11 vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*, J. Mol. Catal.  
12 B Enzym. 44 (2007) 48–52. doi:10.1016/j.molcatb.2006.09.001.
- 13 [19] R.G. Berger, Biotechnology as a source of natural volatile flavours, Curr. Opin.  
14 Food Sci. 1 (2015) 38–43. doi:10.1016/j.cofs.2014.09.003.
- 15 [20] B. Kaur, D. Chakraborty, B. Kumar, Phenolic biotransformations during  
16 conversion of ferulic acid to vanillin by lactic acid bacteria, Biomed Res. Int.  
17 2013 (2013). doi:10.1155/2013/590359.
- 18 [21] E. Rodrigues, L.R.B. Mariutti, A.Z. Mercadante, Carotenoids and phenolic  
19 compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and  
20 their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species, J.  
21 Agric. Food Chem. 61 (2013) 3022–3029. doi:doi.org/10.1021/jf3054214.
- 22 [22] S. Van Beek, F.G. Priest, Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic  
23 acid bacteria isolated during malt whisky fermentation, Appl. Environ.  
24 Microbiol. 66 (2000) 5322–5328. doi:10.1128/AEM.66.12.5322-5328.2000.
- 25 [23] M. Mayumi, M. Tokashiki, M. Tokashiki, K. Uechi, S. Ito, T. Taira,  
26 Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus*  
27 *luchuensis*, J. Biosci. Bioeng. xx (2018). doi:10.1016/j.jbiosc.2018.02.009.
- 28 [24] D. Delneri, G. Degrassi, R. Rizzo, C. V. Bruschi, Degradation of trans-ferulic  
29 and p-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586, Biochim.  
30 Biophys. Acta. 1244 (1995) 363–367. doi:10.1016/0304-4165(95)00021-3.
- 31 [25] P. Hernández-Orte, M. Cersosimo, N. Loscos, J. Cacho, E. Garcia-Moruno, V.  
32 Ferreira, The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of  
33 different genera, Food Chem. 107 (2008) 1064–1077.  
34 doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.032.
- 35 [26] P. Renault, C. Miot-Sertier, P. Marullo, P. Hernández-Orte, L. Lagarrigue, A.  
36 Lonvaud-Funel, M. Bely, Genetic characterization and phenotypic variability in  
37 *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry, Int.  
38 J. Food Microbiol. 134 (2009) 201–210.  
39 doi:doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008.
- 40 [27] D.A.N. Edlin, A. Narbad, J.R. Dickinson, D. Lloyd, The biotransformation of  
41 simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*, FEMS Microbiol. Lett.  
42 125 (1995) 311–315. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07374.x.
- 43 [28] A. Hernández-Almanza, J. Cesar Montanez, M.A. Aguilar-González, C.

- 1 Martínez-Ávila, R. Rodríguez-Herrera, C.N. Aguilar, *Rhodotorula glutinis* as  
2 source of pigments and metabolites for food industry, *Food Biosci.* 5 (2014) 64–  
3 72. doi:doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007.
- 4 [29] Z. Huang, L. Dostal, J.P.N. Rosazza, Mechanisms of ferulic acid conversions to  
5 vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993)  
6 23954–23958. doi:10.1016/S0168-1656(00)00396-5.
- 7 [30] J.B. Sutherland, L.A. Tanner, J.D. Moore, J.P. Freeman, J. Deck, A.J. Williams,  
8 Conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by yeasts isolated from frozen  
9 concentrated orange juice, *J. Food Prot.* 58 (1995) 1260–1262.  
10 doi:doi.org/10.4315/0362-028X-58.11.1260.
- 11 [31] J.A. Donaghy, P.F. Kelly, A. McKay, Conversion of ferulic acid to 4-vinyl  
12 guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice, *J. Sci. Food Agric.* 79  
13 (1999) 453–456. doi:doi.org/10.1002/(SICI)1097-  
14 0010(19990301)79:3<453::AID-JSFA284>3.0.CO;2-H.
- 15 [32] I. Baqueiro-Peña, G. Rodríguez-Serrano, E. González-Zamora, C. Augur, O.  
16 Loera, G. Saucedo-Castañeda, Biotransformation of ferulic acid to 4-  
17 vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*, *Bioresour.*  
18 *Technol.* 101 (2010) 4721–4724. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.086.
- 19 [33] L. Lesage-Meessen, M. Delattre, M. Haon, J.F. Thibault, B.C. Ceccaldi, P.  
20 Brunerie, M. Asther, A two-step bioconversion process for vanillin production  
21 from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnopus cinnabarinus*, *J.*  
22 *Biotechnol.* 50 (1996) 107–113. doi:10.1016/0168-1656(96)01552-0.
- 23 [34] S. Ghosh, A. Sachan, S.K. Sen, A. Mitra, Microbial transformation of ferulic acid  
24 to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637, *J. Ind. Microbiol.*  
25 *Biotechnol.* 34 (2007) 131–138. doi:doi.org/10.1007/s10295-006-0177-1.
- 26 [35] M. Brunati, F. Marinelli, C. Bertolini, R. Gandolfi, D. Daffonchio, F. Molinari,  
27 Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes, *Enzyme*  
28 *Microb. Technol.* 34 (2004) 3–9. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.04.001.
- 29 [36] H. Priefert, J. Rabenhorst, A. Steinbüchel, Biotechnological production of  
30 vanillin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 296–314.  
31 doi:10.1007/s002530100687.
- 32 [37] Q. Zhou, Y. Qian, M.C. Qian, Analysis of volatile phenols in alcoholic beverage  
33 by ethylene glycol-polydimethylsiloxane based stir bar sorptive extraction and  
34 gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1390 (2015) 22–27.  
35 doi:10.1016/j.chroma.2015.02.064.
- 36 [38] I. Mourtzinos, S. Konteles, N. Kalogeropoulos, V.T. Karathanos, Thermal  
37 oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties, *Food*  
38 *Chem.* 114 (2009) 791–797. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.014.
- 39 [39] L. Zheng, P. Zheng, Z. Sun, Y. Bai, J. Wang, X. Guo, Production of vanillin from  
40 waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnopus cinnabarinus*,  
41 *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 1115–1119. doi:10.1016/j.biortech.2006.03.028.
- 42 [40] N. Pérez-Rodríguez, R. Pinheiro de Souza Oliveira, A.M. Torrado Agrasar, J.M.  
43 Domínguez, Ferulic acid transformation into the main vanilla aroma compounds

- 1 by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100 (2016)  
2 1677–1689. doi:10.1007/s00253-015-7005-3.
- 3 [41] E. Topakas, E. Kalogeris, D. Kekos, B.J. Macris, P. Christakopoulos,  
4 Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus  
5 *Sporotrichum thermophile*, LWT - Food Sci. Technol. 36 (2003) 561–565.  
6 doi:10.1016/S0023-6438(03)00060-4.
- 7 [42] B. Max, F. Tugores, S. Cortés-Diéguéz, J.M. Domínguez, Bioprocess design for  
8 the microbial production of natural phenolic compounds by *Debaryomyces*  
9 *hansenii*, Appl. Biochem. Biotechnol. 168 (2012) 2268–2284.  
10 doi:10.1007/s12010-012-9935-x.
- 11 [43] A. Paz, D. Outeiriño, R. Pinheiro de Souza Oliveira, J.M. Domínguez, Fed-batch  
12 production of vanillin by *Bacillus aryabhatai* BA03, N. Biotechnol. 40 (2018)  
13 186–191. doi:10.1016/j.nbt.2017.07.012.
- 14 [44] B. Kaur, D. Chakraborty, Statistical media and process optimization for  
15 biotransformation of rice bran to vanillin using *Pediococcus acidilactici*, Indian  
16 J. Exp. Biol. 51 (2013) 935–943.
- 17 [45] N. Gunnarsson, E.A. Palmqvist, Influence of pH and carbon source on the  
18 production of vanillin from ferulic acid by *Streptomyces setonii* ATCC 39116,  
19 Dev. Food Sci. 43 (2006) 73–76. doi:10.1016/S0167-4501(06)80018-X.
- 20 [46] E.H. Hansen, B.L. Møller, G.R. Kock, C.M. Büchner, C. Kristensen, O.R. Jensen,  
21 F.T. Okkels, C.E. Olsen, M.S. Motawia, J. Hansen, *De novo* biosynthesis of  
22 Vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast  
23 (*Saccharomyces cerevisiae*), Appl. Environ. Microbiol. 75 (2009) 2765–2774.  
24 doi:10.1128/AEM.02681-08.
- 25 [47] A. Narbad, M.J. Gasson, Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel  
26 CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*,  
27 Microbiology. 144 (1998) 1397–1405. doi:10.1099/00221287-144-5-1397.
- 28 [48] M. Karishma, V.D. Trivedi, A. Choudhary, A. Mhatre, P. Kambli, J. Desai, P.S.  
29 Phale, Analysis of preference for carbon source utilization among three strains of  
30 aromatic compounds degrading *Pseudomonas*, FEMS Microbiol. Lett. 362  
31 (2015) fmv139. doi:10.1093/femsle/fmv139.
- 32 [49] D. Di Gioia, F. Luziatelli, A. Negroni, A.G. Ficca, F. Fava, M. Ruzzi, Metabolic  
33 engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from  
34 ferulic acid, J. Biotechnol. 156 (2011) 309–316.  
35 doi:10.1016/j.jbiotec.2011.08.014.
- 36 [50] P.T. Adeboye, M. Bettiga, F. Aldaeus, P.T. Larsson, L. Olsson, Catabolism of  
37 coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces*  
38 *cerevisiae* yields less toxic products, Microb. Cell Fact. 14 (2015) 149.  
39 doi:10.1186/s12934-015-0338-x.
- 40 [51] D.R. Durham, C.G. McNamee, D.B. Stewart, Dissimilation of aromatic  
41 compounds in *Rhodotorula graminis*: biochemical characterization of  
42 pleiotropically negative mutants, J. Bacteriol. 160 (1984) 771–777. doi:0021-  
43 9193/84/110771-07\$02.00/0.

- 1 [52] J.K. Gupta, C. Jebsen, H. Kneifel, Sinapic acid degradation by the yeast  
2 *Rhodotorula glutinis*, J. Gen. Microbiol. 132 (1986) 2793–2799.  
3 doi:doi.org/10.1099/00221287-132-10-2793.
- 4 [53] X. Li, J. Yang, X. Li, W. Gu, J. Huang, K.Q. Zhang, The metabolism of ferulic  
5 acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp. Px6-4 isolated from  
6 *Vanilla* root, Process Biochem. 43 (2008) 1132–1137.  
7 doi:10.1016/j.procbio.2008.06.006.
- 8 [54] Z. Huang, L. Dostal, J.P.N. Rosazza, Microbial transformations of ferulic acid by  
9 *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*, Appl. Environ.  
10 Microbiol. 59 (1993) 2244–2250. doi:10.1128/aem.59.7.2244-2250.1993.
- 11 [55] P. Torre, D. De Faveri, P. Perego, A. Converti, P. Barghini, M. Ruzzi, F.P. Faria,  
12 Selection of co-substrate and aeration conditions for vanillin production by  
13 *Escherichia coli* JM109/pBB1, Food Technol. Biotechnol. 42 (2004) 193–196.
- 14 [56] A. V. Tran, R.P. Chambers, Red oak wood derived inhibitors in the ethanol  
15 fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776, Biotechnol. Lett. 7 (1985)  
16 841–845. doi:10.1007/BF01025567.
- 17 [57] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto, Ferulic and p-coumaric acids extraction  
18 by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, Ind. Crops Prod. 25 (2007) 231–  
19 237. doi:10.1016/j.indcrop.2006.11.001.
- 20 [58] A. Świzdor, A. Panek, N. Milecka-Tronina, T. Kołek, Biotransformations  
21 utilizing  $\beta$ -oxidation cycle reactions in the synthesis of natural compounds and  
22 medicines, Int. J. Mol. Sci. 13 (2012) 16514–16543. doi:10.3390/ijms131216514.
- 23 [59] A. Dhar, K.S. Lee, K. Dhar, J.P.N. Rosazza, Nocardia sp. vanillic acid  
24 decarboxylase, Enzyme Microb. Technol. 41 (2007) 271–277.  
25 doi:10.1016/j.enzmictec.2007.02.002.
- 26 [60] L.-H. Sun, S.-W. Lv, F. Yu, S.-N. Li, L.-Y. He, Biosynthesis of 4-vinylguaiacol  
27 from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056, J. Biotechnol. 281  
28 (2018) 144–149. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.07.021.
- 29 [61] B. Kaur, D. Chakraborty, G. Kaur, G. Kaur, Biotransformation of rice bran to  
30 ferulic acid by pediococcal isolates, Appl. Biochem. Biotechnol. 170 (2013) 854–  
31 867. doi:10.1007/s12010-013-0223-1.
- 32 [62] N. Buron, H. Guichard, E. Coton, J. Ledauphin, D. Barillier, Evidence of 4-  
33 ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French ciders,  
34 Food Chem. 125 (2011) 542–548. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.046.
- 35 [63] P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J. -n Boidron, V. Lavigne, Synthesis of volatile  
36 phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines, J. Sci. Food Agric. 62 (1993)  
37 191–202. doi:http://doi.org/10.1002/jsfa.2740620213.

38

39

40

## CAPÍTULO III

Neste capítulo, estão descritos os experimentos e resultados obtidos durante a cinética de crescimento de linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando o hidrolisado ácido de cascas de aveia e arroz como substrato.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial corresponde a aproximadamente 23 % do PIB brasileiro (IBGE, 2017) e, anualmente, um volume significativo de biomassa na forma de resíduo sólido é produzido, provocando forte impacto ambiental e consequente perda de recursos naturais potencialmente valiosos para a produção biotecnológica de enzimas, vitaminas e outras biomoléculas (ASGHER; AHMAD; IQBAL, 2013).

Dentre estes resíduos, destacam-se os resíduos lignocelulósicos, que podem ser de origem agrícola, florestal ou advindos da indústria papelreira, e representam uma fonte de matéria-prima renovável, abundante e eficiente na obtenção de diversos compostos de interesse na indústria de alimentos e também na produção de biocombustíveis (PALONEN, 2004). No Rio Grande do Sul, a biomassa lignocelulósica é proveniente majoritariamente dos resíduos agroindustriais da soja, aveia e arroz (IBGE, 2016).

Na produção de insumos alimentícios, a utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria demonstra grande vantagem para o setor, uma vez que agrega valor à um substrato normalmente descartado, cuja principal função é a alimentação animal, através da aplicação de bioprocessos para obtenção de aditivos naturais, além de representar uma diminuição nos custos nas formulações de meios de crescimento, uma vez que são substratos ricos em carboidratos (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Esta dissertação de mestrado faz parte de um projeto denominado “*Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de xilooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, fosfooligossacarídeos e aromas por leveduras em bioprocessos*” do Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise (BBB) da UFRGS. Este projeto compõe uma linha de pesquisa permanente do laboratório, ativa desde 2008, e tem como principal objetivo a utilização de resíduos da agroindústria gaúcha, especialmente resíduos lignocelulósicos, para obtenção de produtos de valor agregado como etanol, xilitol, 2,3-butanodiol, aromas e fibras prebióticas como xilo- e fosfo-oligossacarídeos.



Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo inicial investigar e avaliar a obtenção biotecnológica de aromas vaniloides utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### **Materiais e microrganismos**

As cascas de aveia e arroz utilizadas foram adquiridas de produtores locais da cidade de Camaquã (RS).

Duas linhagens de *R. mucilaginosa* foram utilizadas nos experimentos de bioconversão dos hidrolisados em aromas vaniloides (UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647). Ambas fazem parte da Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram cedidas para este trabalho pelo Professor Carlos Augusto Rosa.

Para manutenção celular e seu uso nos experimentos, as linhagens foram mantidas em um meio contendo 40 % de glicerol como crioprotetor a -80 °C no Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos (BiotecLab) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

### **Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos**

As cascas de arroz e aveia foram moídas e submetidas previamente à hidrólise ácida diluída, para a solubilização da fração de hemicelulose, conforme metodologia descrita por Cassales *et al.* (2011) com algumas modificações (DA CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011). Os hidrolisados ácidos foram preparados em autoclave à 121 °C e 1 atm, com relação sólido:líquido de 1:10 (casca:ácido sulfúrico 1 % v/v) com tempo de reação de 60 min para a casca de arroz (HAA) e 40 min para as cascas de aveia (HAAV). O resíduo sólido resultante da hidrólise foi separado por filtração com funil e o sobrenadante armazenado à -20 °C até o momento dos experimentos.

Para os cultivos, o pH dos hidrolisados foi corrigido para 6,5 com hidróxido de sódio sólido e submetidos a centrifugação (3500 g, 15 min, 4 °C) para remoção de proteínas precipitadas e outras impurezas. A esterilização dos hidrolisados foi realizada em autoclave a 111 °C e 0,5 atm durante 30 min.

### **Biossíntese de aromas utilizando hidrolisados ácidos lignocelulósicos**

Os ensaios de biossíntese foram realizados em agitador orbital em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de hidrolisado ácido (HAA ou HAAV).

Para obtenção de biomassa metabolicamente ativa, as linhagens foram primeiramente cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura YM sólido (Yeast Malt) composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de dextrose, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte e 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, com incubação por 24 h e 30 °C.

Após a incubação, as culturas foram transferidas com auxílio de uma alça de platina estéril para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio YM líquido (1 % glicose, 0,5 % peptona, 0,3 % extrato de levedura, 0,3 % extrato de levedura) e cultivadas por aproximadamente 14 h a 30 °C e 120 rpm, até atingir densidade ótica (DO<sub>600 nm</sub>) igual a 1. A suspensão celular foi centrifugada (3500 g, 15 min, 4 °C) e ressuspendida em 10 mL do hidrolisado a ser avaliado, compondo 10 % do volume de meio total do experimento.

Os frascos foram mantidos sob agitação em incubadora rotacional a 120 rpm, durante 72 h a 30 °C. As amostras foram coletadas durante intervalos pré-estabelecidos para avaliação de pH por pHmetro digital (Kasvi, Paraná), e em seguida, centrifugadas a 3500 g por 15 min a 4 °C para separação das células e coleta do sobrenadante, mantido em *freezer* (-20 °C) até posterior análise cromatográfica.

### **Métodos analíticos**

A análise dos componentes do material lignocelulósico hidrolisado foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, visando a determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, além da quantificação de ácido ferúlico.

Para a quantificação dos açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético foi utilizada uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (9 µm, 300 x 7,8 mm, Bio-Rad, EUA) acoplada a um detector de índice de refração (RI), utilizando ácido sulfúrico 5 Mm como eluente. As condições da corrida cromatográfica foram: fluxo isocrático de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura de 45 °C e tempo de 23 min.

Para a quantificação de ácido ferúlico nos hidrolisados, foi utilizada uma coluna Shimpack CLC-ODS C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Shimadzu, Japão) em conjunto com um detector de arranjo de diodos (DAD) a um fluxo de 0,9 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 29 °C, conforme metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2013). A fase móvel consiste em uma

solução de água e ácido fórmico (solvente A, 99,5:0,5, v/v) e acetonitrila e ácido fórmico (solvente B, 99,5:0,5, v/v) em um gradiente linear de A/B 99:1 até 50:50 em 50 min; 50:50 até 1:99 em 5 min, sendo mantida esta proporção por mais 5 min. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e todos os cromatogramas foram processados à 280 e 323 nm.

### **Cálculo de parâmetros cinéticos e análise estatística**

Os percentuais de consumo dos açúcares e compostos fenólicos foram calculados de acordo com a Equação 1.

$$Consumo (\%) = \frac{S}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

Em que  $S_0$  é a concentração inicial de substrato (em  $g.L^{-1}$  para os açúcares e  $mg.L^{-1}$  para ácido ferúlico, vanilina e ácido vanílico) e  $S$  é a concentração final de substrato (em  $g.L^{-1}$  para os açúcares e  $mg.L^{-1}$  para ácido ferúlico, vanilina e ácido vanílico).

A produtividade volumétrica de ácido vanílico dos ensaios fermentativos foi determinada de acordo com a Equação 2.

$$Q_P = \frac{P_{VA}}{t} \quad (2)$$

Em que  $Q_P$  é a produtividade volumétrica, em  $[mg.(L \cdot h)^{-1}]$ ;  $P_{VA}$  é a máxima concentração obtida de ácido vanílico (em  $mg.L^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo necessário para atingir a máxima concentração de ácido vanílico, em h.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). A análise de significância foi realizada pelo teste T de Student, considerando como diferença significativa valores de  $p < 0,05$ . Para todos os cálculos, foram utilizadas as médias das duplicatas obtidas durante as experiências de fermentação.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Composição dos hidrolisados de casca de soja, arroz e aveia

A Tabela 1 apresenta a composição química dos hidrolisados de aveia e arroz, respectivamente, empregados no presente trabalho.

Tabela 1. Composição química (em g.L<sup>-1</sup>, em base úmida) dos hidrolisados ácidos de casca de aveia (HAAV) e casca de arroz (HAA).

	Hidrolisado ácido de aveia	Hidrolisado ácido de arroz
Glicose	2,18	2,87
Arabinose	1,08	1,39
Xilose	7,92	10,43
Ácido acético	1,11	1,44
Ácido ferúlico	0,205	0,154
Vanilina	0,048	0,053
Ácido vanílico	0,056	0,064

Nos hidrolisados estudados, pode-se observar que a xilose é o açúcar majoritário (aproximadamente 71 %), seguido de glicose e arabinose em menores concentrações, em comportamento semelhante ao relatado em outros estudos com cascas de soja (QING et al., 2017), aveia (TAMANINI et al., 2004) e casca de arroz (SAHA et al., 2005) submetidas ao tratamento ácido diluído.

Dentre os pré-tratamentos possíveis para a utilização de biomassas lignocelulósicas como substrato em bioprocessos, a hidrólise ácida diluída é considerada uma das técnicas mais eficientes em relação a liberação de açúcares, pois atua principalmente na degradação da fração de hemicelulose (KUMAR et al., 2009). A temperatura de hidrólise é um dos fatores essenciais a serem controlados neste tipo de tratamento, uma vez que compostos tóxicos e inibitórios do metabolismo microbiano podem ser formados pela degradação da xilose e arabinose em altas temperaturas, acarretando na formação de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (VERARDI et al., 2012).

Com relação a degradação da biomassa lignocelulósica, podemos citar quatro grupos de compostos inibitórios ao metabolismo de leveduras e bactérias que podem ser formados durante

a hidrólise: produtos da degradação dos açúcares, como 5-hidroxiacetilfurfural e furfural; produtos da degradação da lignina como como ácidos ferúlico, cafeico,  $\rho$ -coumárico, vanílico, siríngico, além de aldeídos como vanilina e 4-hidroxibenzaldeído, entre outros; compostos derivados da estrutura lignocelulósica, como ácido acético; e metais pesados ou outros minerais originados da corrosão dos equipamentos utilizados durante o processo ou naturais da biomassa (LEONARD; HAJNY, 1945; MUSSATTO; ROBERTO, 2004a).

Uma vez que este trabalho possuía o objetivo principal de avaliar a obtenção biotecnológica de aromas como vanilina e ácido vanílico a partir do ácido ferúlico presente no hidrolisado, apenas estes componentes foram quantificados, mas foi possível detectar a presença de ácido  $\rho$ -coumárico, furfural e 5-HMF após a hidrólise.

Em estudos envolvendo a produção de aromas vaniloides a partir de hidrolisados lignocelulósicos, é comum a utilização da hidrólise alcalina, uma vez que este pré-tratamento atua especificamente na liberação de compostos fenólicos (TORRES et al., 2009). Entretanto, considerando o local de ocorrência de ácido ferúlico em plantas estar relacionado majoritariamente à estrutura hemicelulósica, a partir de ligações ésteres, a hidrólise ácida diluída também pode ser uma alternativa no tratamento de biomassas ricas em hemicelulose, como as cascas de aveia e arroz (ISIKGOR; BECER, 2015).

Mussatto *et al.* (2007) avaliando a liberação de ácido ferúlico e  $\rho$ -coumárico de malte de cevada, ao aplicar tratamento ácido previamente a hidrólise alcalina, utilizando 100 mg de ácido sulfúrico por grama de matéria seca, em uma proporção sólido:líquido 1:8 (p/p) a 120 °C por 17 min, obteve solubilização de aproximadamente 14 % de lignina da biomassa lignocelulósica, resultando na liberação de 51 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico e 31 mg.L<sup>-1</sup> de vanilina. Nesta etapa, observou-se que não houve liberação de ácido  $\rho$ -coumárico no hidrolisado, apenas ácido ferúlico, corroborando a hipótese de a liberação deste composto fenólico por esse tipo de hidrólise estar estritamente associado à estrutura do ácido ferúlico em grãos, sendo parcialmente solubilizado junto com as estruturas de arabinoxilanas.

Ao avaliar a hidrólise alcalina de espiga de milho, Torre *et al.* (2008) obteve preliminarmente concentração máxima de ácido ferúlico de 248,5 mg.L<sup>-1</sup>, utilizando hidróxido de sódio 1,0 M durante 24 h em uma proporção de 0,028 g de espiga.g<sup>-1</sup> de solução, em valores muito próximos aos obtidos neste trabalho com a aplicação do tratamento ácido diluído. A liberação de ácido ferúlico e retenção das frações de hemicelulose e celulose ocorreu com a

otimização da hidrólise, alcançando aproximadamente 1,17 g.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico utilizando hidróxido de sódio 0,5 M e aumentando a proporção de espiga:solução alcalina para 0,084 g.g<sup>-1</sup>.

A presença de compostos como vanilina e ácido vanílico em pequenas concentrações nos hidrolisados de aveia e arroz (entre 48 e 64 mg.L<sup>-1</sup>) após a hidrólise ácida é consequência principalmente da degradação térmica da lignina e já foi relatada em outros trabalhos utilizando malte de cevada (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2007), palha de arroz (MUSSATTO; ROBERTO, 2004b) e aveia vermelha (TRAN; CHAMBERS, 1985).

### **Avaliação da cinética de bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos em aromas vaniloides por linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa***

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são leveduras oleaginosas, bastante utilizadas na produção de diversos ácidos graxos para utilização na síntese de biodiesel, além de serem conhecidas por sua coloração em tons de vermelho e laranja, devido a produção de carotenoides de forma intracelular (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014). Diversas espécies de *Rhodotorula* são comensais na natureza e em alguns mamíferos. As leveduras podem ser facilmente encontradas no ar, solo, ambientes aquáticos como lagos e oceanos, além de alguns naturalmente presente em determinados produtos lácteos.

O cultivo destas leveduras em resíduos agroindustriais visando a obtenção de compostos de valor agregado já foi relatado por diversos autores, exibindo resultados promissores na produção de pigmentos como torularodina, β-caroteno e toruleno (BUZZINI; MARTINI, 2000) além de ácidos graxos como ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) (GALAFASSI et al., 2012; MAST et al., 2014). Este é o primeiro trabalho realizado visando a obtenção de aromas fenólicos por linhagens de *Rhodotorula* utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

O metabolismo de síntese de aromas vaniloides por leveduras do gênero *Rhodotorula*, especialmente a linhagem *R. mucilaginosa*, embora ainda não seja completamente esclarecido, requer obrigatoriamente a presença de um precursor fenólico no meio reacional para a obtenção de aromas como ácido vanílico, vanilina e guaiacol (HUANG; DOSTAL; ROSAZZA, 1993). Portanto, o consumo de açúcares observado em todos os experimentos em hidrolisados está relacionado estritamente a produção de biomassa, ácidos graxos e outros compostos, como carotenoides, além da manutenção celular das leveduras, sem influência na concentração de metabólitos obtida ao final do cultivo.

Ao avaliar a cinética de crescimento e a bioconversão dos hidrolisados hemicelulósicos de casca de arroz e aveia por linhagens de *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647, observou-se primeiramente uma redução substancial no teor inicial de ácido ferúlico (entre 52 % e 62 % em HAA e 69 % e 88 % em HAAV). Esta degradação ocorreu em função da esterilização por autoclave dos meios de cultivo, etapa realizada preliminarmente ao inóculo, mas que provocou a degradação do ácido ferúlico presente no hidrolisado, em função de sua baixa estabilidade em altas temperaturas (FIDDLER et al., 1967).

O aquecimento de ácidos hidroxicinâmicos catalisa a reação de descarboxilação de compostos fenólicos, produzindo componentes de menor peso molecular e com impacto aromático, como o 4-vinilguaiacol (MAGA; KATZ, 1978). Em hidrolisados com componentes termosensíveis, uma alternativa de esterilização para garantir a preservação destes compostos no meio de cultura é a esterilização por filtração, mas que apresenta problemáticas em relação ao nível de impurezas do hidrolisado, capacidade de retenção das membranas e outras dificuldades operacionais.

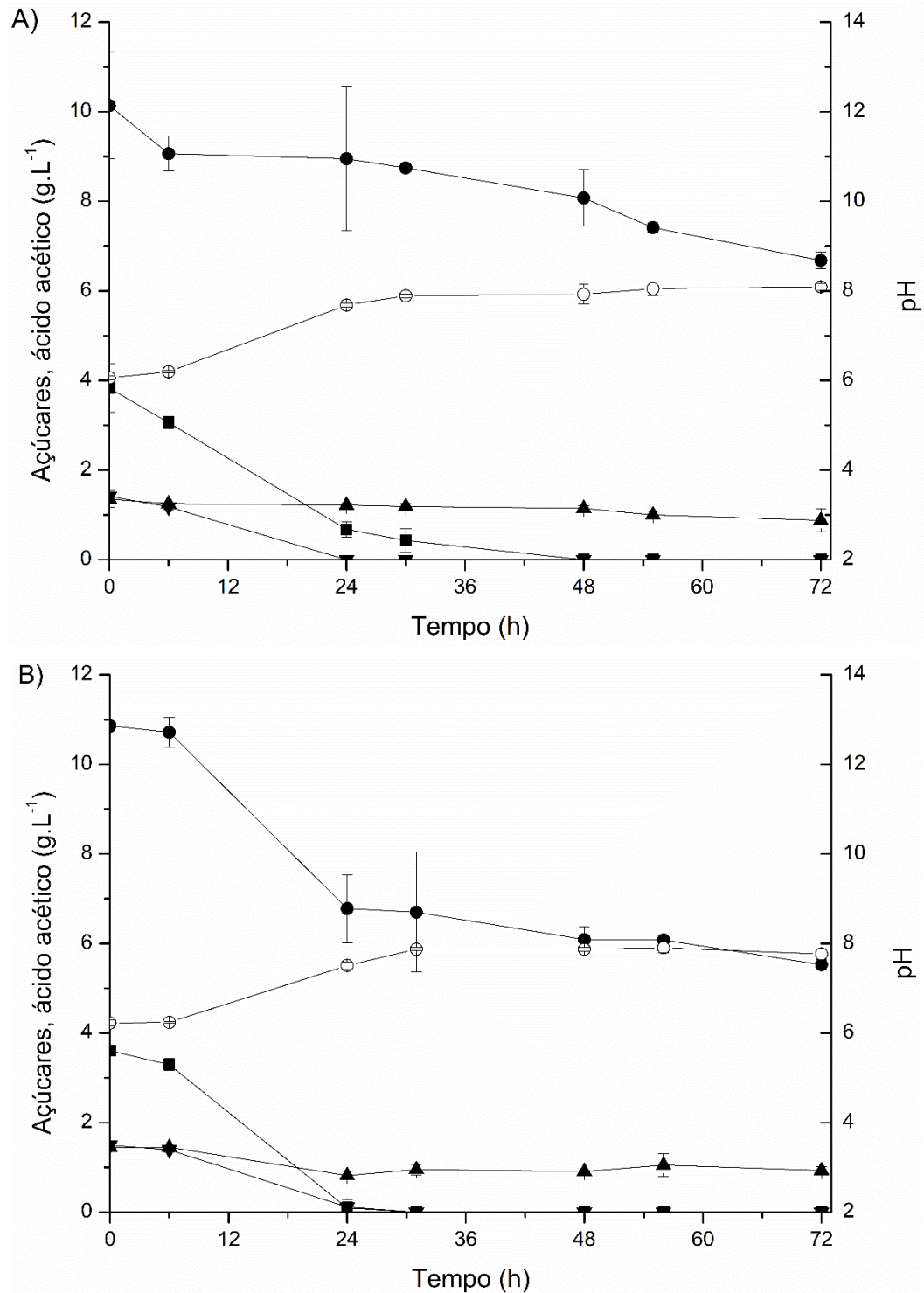
As linhagens UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647 demonstraram rápida adaptação a ambos hidrolisados, corroborando com o potencial já demonstrado por diversas espécies de *Rhodotorula* em outros estudos, com o objetivo de produzir metabólitos de valor agregado com aplicação na indústria de alimentos, como aromas, ácidos graxos e pigmentos naturais utilizando resíduos agroindustriais (BUZZINI; MARTINI, 2000; GALAFASSI et al., 2012; HAINAL et al., 2012; LI et al., 2010; MAST et al., 2014)

A Figura 1 apresenta os gráficos de cinética de bioconversão dos açúcares em HAA pela ação das linhagens UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM-Y2190 (B), respectivamente. A levedura *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 apresentou comportamento semelhante com relação ao metabolismo de açúcares em ambos os hidrolisados (Figuras 1A e 2A), consumindo rapidamente a glicose, presente em menores concentrações ( $3,83 \pm 0,54 \text{ g.L}^{-1}$  e  $3,65 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$ ). Com relação a xilose, açúcar predominante nos hidrolisados de arroz e aveia, observou-se um consumo máximo de  $20 \pm 8 \%$  em HAA e  $16 \pm 3 \%$  em HAAV.

Linhagens do gênero *Rhodotorula* possuem a habilidade de metabolizar diversos açúcares, como sacarose, ribose, rafinose e xilose. Li *et al.* (2010) demonstrou o consumo de xilose (2 % p/v) por uma linhagem de *R. mucilaginosa* isolada do ambiente marinho, resultando em aproximadamente  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa seca. Por sua vez, a linhagem *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y2190 apresentou melhor capacidade de assimilar pentoses, com consumo de xilose entre 44 % e 47 %, indicando as primeiras diferenças de metabolismo entre as leveduras.

Entretanto, não foi observado consumo de arabinose em nenhum dos experimentos por ambas linhagens.

Figura 1. Avaliação da cinética de consumo de açúcares de *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM- Y2190 (B) em hidrolisado ácido de arroz, em que (○) pH, (●) xilose, (▲) arabinose, (▼) ácido acético e (■) glicose.





Em todas as linhagens e hidrolisados testados, o ácido acético, composto conhecidamente tóxico em meios hidrolisados lignocelulósicos, não apresentou efeito inibitório ao metabolismo celular em nenhum dos cenários avaliados. Este composto, presente em concentrações menores que  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  em todas as condições, foi rapidamente metabolizado pelas leveduras, provocando um aumento no pH de aproximadamente 34 % em todos os casos.

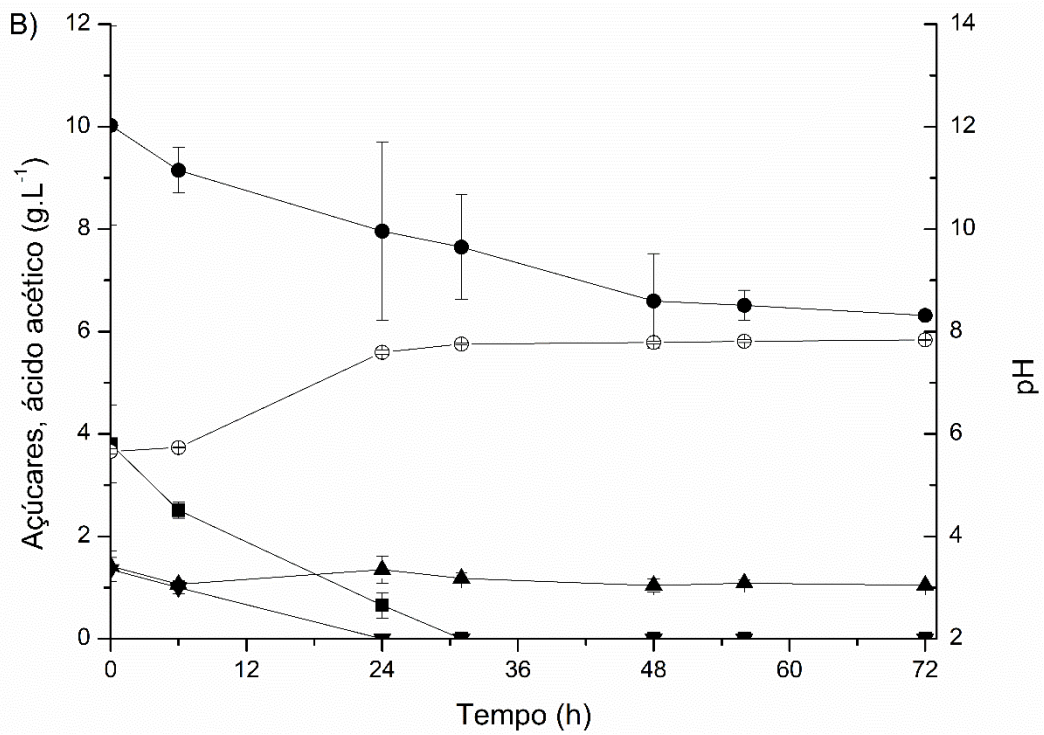
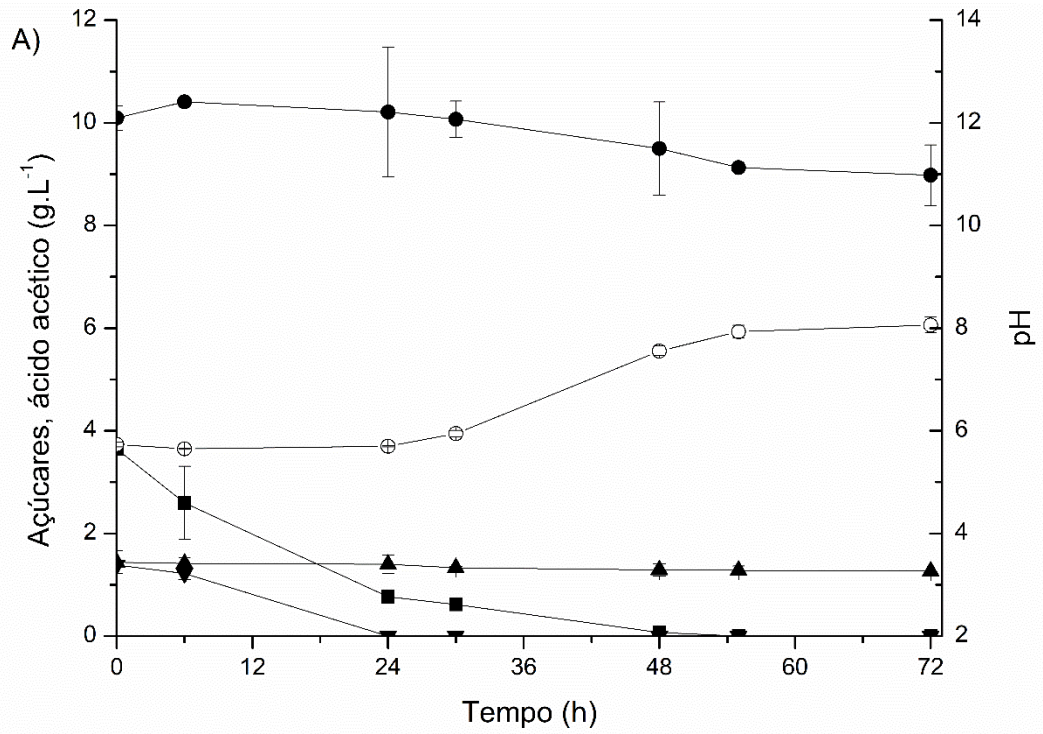
No metabolismo de *R. glutinis*, a ocorrência simultânea de glicose e xilose em meios hidrolisados favoreceu a diminuição do efeito inibitório do ácido acético, sendo a toxicidade do ácido acético mais acentuada em meio sintético contendo apenas glicose (ZHANG et al., 2011). Durante a produção de lipídeos por *R. graminis*, Galafassi *et al.* (2012) relatou a habilidade destas leveduras crescerem na presença de até  $3 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido acético sem prejudicar seu crescimento nem afetar negativamente a produção de ácidos graxos.

Com relação aos compostos fenólicos, não foi possível obter a produção de vanilina a partir de nenhuma das linhagens testadas em hidrolisado de aveia e arroz. A levedura UFMG-CM-Y3647 demonstrou maior habilidade no metabolismo de compostos fenólicos, resultando no consumo de  $20 \pm 4 \%$  de ácido ferúlico em HAA (Figura 3A) e  $68 \pm 7 \%$  em HAAV (Figura 4A). Diferentemente da levedura UFMG-CM-Y2190, foi possível observar o consumo de vanilina em ambos hidrolisados ( $37 \pm 3 \%$  em HAA e  $62 \pm 3 \%$  em HAAV) nas primeiras 6 h, resultando no aparecimento de ácido vanílico no meio de cultura ( $7,43 \pm 1,57 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAA e  $11,75 \pm 1,68 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAAV).

A oxidação de vanilina em ácido vanílico é recorrente do metabolismo de diversos microrganismos, podendo ser associada com a ação da enzima vanilina desidrogenase (VDH), responsável por catalisar essa reação (PRIEFERT; RABENHORST; STEINBÜCHEL, 2001). A formação transiente de vanilina pela linhagem UFMG-CM-Y3647 também foi observada em meio sintético (Capítulo II), resultando no acúmulo de ácido vanílico como produto majoritário da degradação do ácido ferúlico.

A partir de 30 h de cultivo, foi possível observar um decréscimo na concentração de ácido vanílico pela levedura *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647, com destaque para HAAV, em que foi verificado consumo de aproximadamente 54 % da produção obtida para o metabólito. Em meio sintético, também foi possível observar o consumo de ácido vanílico pela linhagem UFMG-CM-Y3647 (Capítulo II) imediatamente após a exaustão de ácido ferúlico no meio de cultivo.

Figura 2. Avaliação da cinética de consumo de açúcares de *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM- Y2190 (B) em hidrolisado ácido de aveia, em que (○) pH, (●) xilose, (▲) arabinose, (▼) ácido acético e (■) glicose.



A habilidade de assimilação de ácido vanílico já foi observada em linhagens de *R. mucilaginosa* (anteriormente *R. rubra*) por Huang et al. (1993), resultando na formação de guaiacol através de uma reação de descarboxilação. Em um experimento avaliando a incorporação de isótopos de deutério em células de *R. mucilaginosa* em fase de crescimento estacionária, foi possível observar que o mecanismo de descarboxilação compreende a tautomerização enzimática do ácido vanílico através do grupo  $\rho$ -hidroxil em um intermediário quinóide antes da descarboxilação.

A linhagem UFMG-CM-Y2190, por sua vez, apresentou capacidade limitada na assimilação do ácido ferúlico presente em ambos hidrolisados avaliados (Figura 3B e 4B), com consumo menor que 3 % nos dois casos. A vanilina, presente em concentrações entre  $18,71 \pm 1,14 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAAV e  $22,45 \pm 1,18 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAA foi parcialmente consumida no hidrolisado ácido de arroz ( $25 \pm 2 \%$ ), mas o mesmo comportamento não foi observado no hidrolisado ácido de aveia.

Em ambos hidrolisados houve produção de ácido vanílico, obtendo-se  $6,97 \pm 3,35 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAA e  $10,49 \pm 3,64 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAAV. A formação de ácido vanílico neste caso pode ser explicada pela assimilação de outros compostos fenólicos, como ácido cafeico e  $\rho$ -coumárico, presentes no hidrolisado. Torres *et al.* (2009) ao utilizar ácido  $\rho$ -coumárico como fonte exclusiva de carbono na bioconversão de *E. coli* JM109/pBB1, obteve produção somente de ácido vanílico e álcool vanílico, sem detecção de vanilina no meio de cultura.

Ainda, observou-se que a linhagem UFMG-CM-Y2190 alcançou a máxima produtividade de ácido vanílico em 24 h no HAA e 31 h em HAAV, quando, em decorrência do desaparecimento do ácido acético, o pH de ambos experimentos atingiu 7,5. Huang *et al.* (1993), durante experimentos de bioconversão de ácido ferúlico em meio sintético por *R. mucilaginosa* utilizou pH 7,0, em cultivos em frascos com células e extrato celular, resultando na produção de ácido vanílico e guaiacol em ambos os casos.

Embora o ácido acético presente no início dos cultivos tenha sido rapidamente metabolizado em todas as condições avaliadas, é possível observar que o aumento progressivo de pH provocou um efeito negativo no consumo de ácido ferúlico pelas linhagens UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647, a partir de 24 h, podendo estar relacionado com a perda de atividade da enzima FDC, responsável pela etapa inicial da reação de degradação do ácido ferúlico (KAUR; CHAKRABORTY; KUMAR, 2013).

O comportamento das linhagens UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-Y2190 em meio sintético (Capítulo II) indicam que o pH desempenha um papel essencial no metabolismo de compostos fenólicos, indicando que em maiores concentrações de ácido ferúlico e em condições de pH controlado, os resultados em hidrolisados possam ser maximizados.

Na Tabela 2 estão apresentados os cálculos de parâmetros cinéticos obtidos para as linhagens UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647, avaliados a partir dos valores máximos de produção de ácido vanílico. Em termos de produtividade, a linhagem UFMG-CM-Y3647 demonstrou em 24 h produtividade de  $0,31 \pm 0,07 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  em HAA e  $0,49 \pm 0,07 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  em HAAV, entretanto não houve diferença significativa entre os resultados apresentados.

Utilizando resíduo de farelo de arroz desengordurado, em uma estratégia em duas etapas para obtenção de vanilina, Zheng *et al.* (2007) estudou o cultivo de *Aspergillus niger* para produção de ácido vanílico que foi subsequentemente convertido em vanilina por *Pycnoporus cinnabarinus*. A maior conversão observada para ácido vanílico foi de  $1,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  em 72 h, resultando em uma produtividade de  $15,2 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , uma das maiores já relatadas em microrganismos selvagens.

Tabela 2. Produção máxima observada de ácido vanílico ( $P_{VA}$ ), em  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , e produtividade calculada, em  $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  das linhagens utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Resíduo	$P_{VA}$ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$Q_P$ ( $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ )
<i>R. mucilaginosa</i>	HAA	$7,43 \pm 1,57^a$	$0,31 \pm 0,07^a$
UFMG-CM-Y3647	HAAV	$11,75 \pm 1,68^a$	$0,49 \pm 0,07^a$
<i>R. mucilaginosa</i>	HAA	$6,97 \pm 3,35^a$	$0,29 \pm 0,14^a$
UFMG-CM-Y2190	HAAV	$10,49 \pm 3,64^a$	$0,34 \pm 0,12^{a*}$

\* Produtividade calculada em 31 h.

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade.

Figura 3. Avaliação da cinética de consumo de fenólicos em *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM-Y2190 (B) em hidrolisado ácido de arroz, em que (▶) ácido ferúlico, (◇) ácido vanílico e (☆) vanilina.

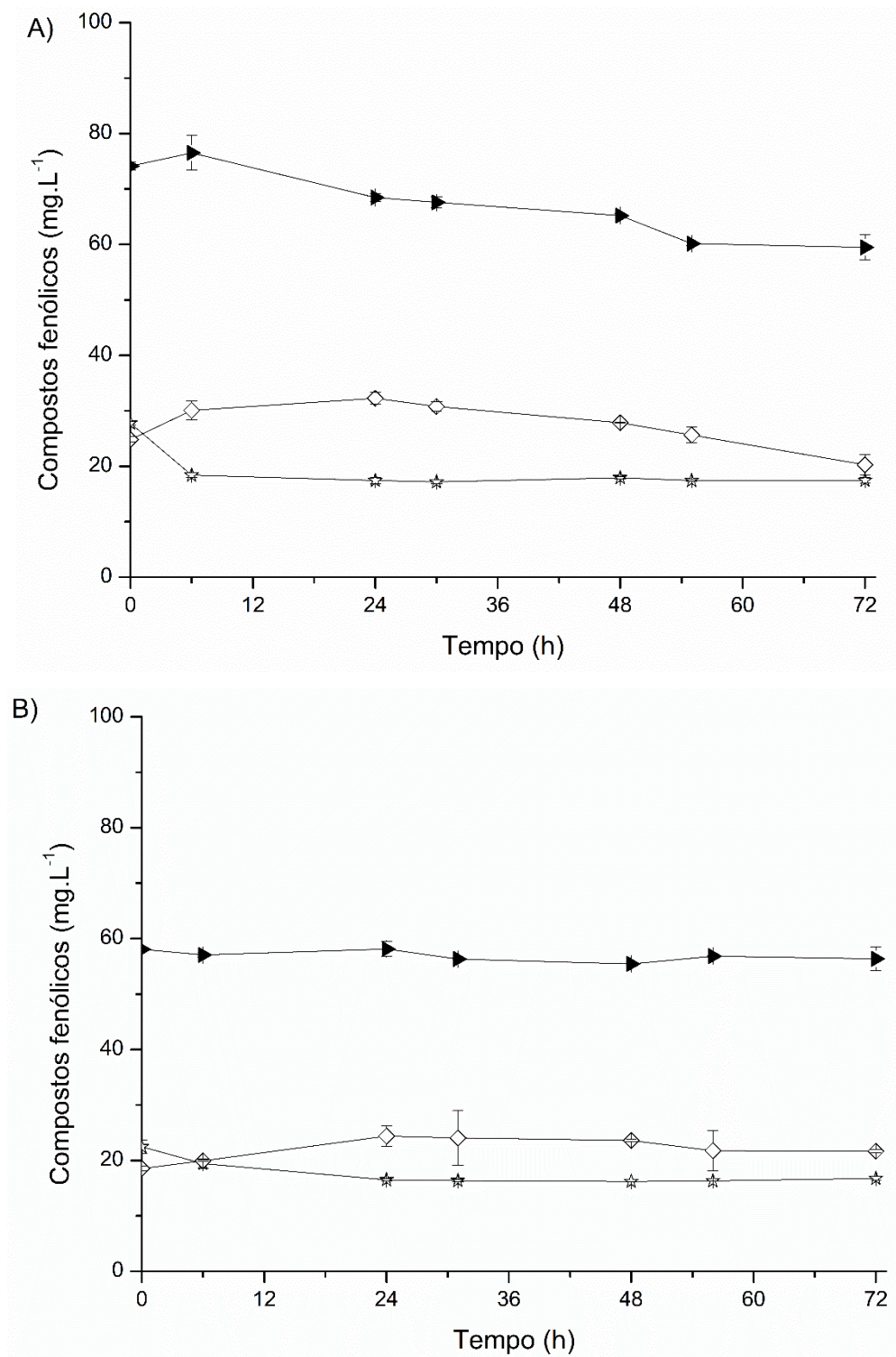
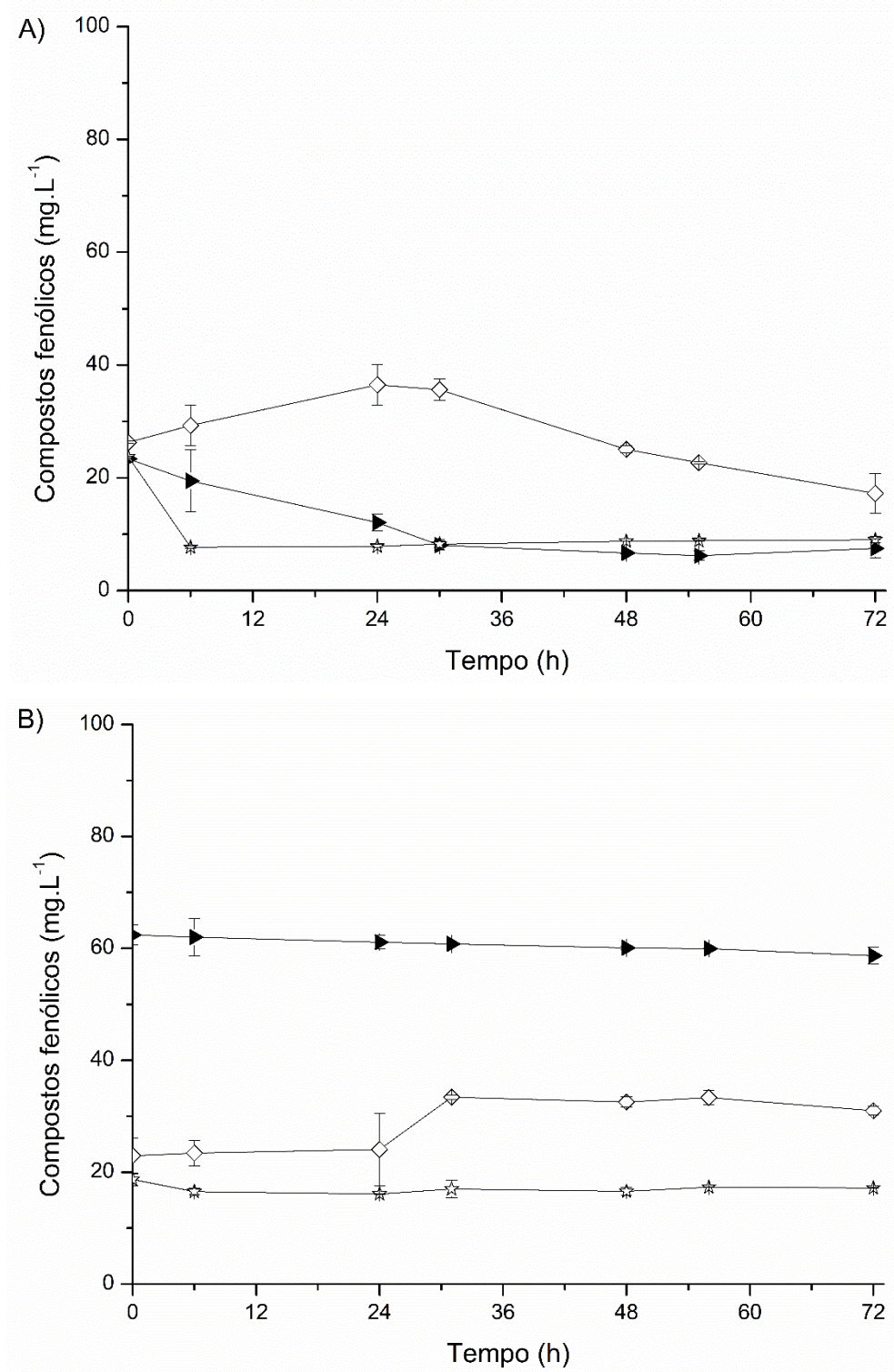


Figura 4. Avaliação da cinética de consumo de fenólicos em *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 (A) e UFMG-CM-Y2190 (B) em hidrolisado ácido de aveia, em que (►) ácido ferúlico, (◊) ácido vanílico e (☆) vanilina.



### 3.4 CONCLUSÃO

Para investigar a produção biotecnológica de aromas vaniloides, especificamente vanilina e ácido vanílico, utilizando resíduos agroindustriais como substrato, este trabalho avaliou o crescimento e a cinética de consumo de *Rhodotorula mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-Y2190, linhagens isoladas da biodiversidade brasileira.

Neste estudo, foram utilizados hidrolisados de casca de arroz (HAA) e aveia (HAAV), obtidos por meio de hidrólise ácida diluída. O pré-tratamento resultou em um hidrolisado rico em xilose, em torno de 70 % de sua composição de açúcares totais, além da liberação de 0,154 g.L<sup>-1</sup> e 0,205 g.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico, principal precursor de aromas fenólicos. A esterilização por autoclavagem do meio de cultura resultou na perda de 50 % a 60 % do teor inicial de ácido ferúlico, prejudicando a máxima obtenção de aromas pelos microrganismos.

As linhagens UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647 demonstraram boa adaptação aos dois hidrolisados avaliados, não sendo observada inibição aos compostos tóxicos resultantes da hidrólise, indicando potencial de uso deste material como substrato em bioprocessos. A glicose e o ácido acético foram rapidamente consumidos em todas as condições avaliadas, havendo variação do consumo de xilose entre as linhagens, sendo a linhagem UFMG-CM-Y2190 a que apresentou maior capacidade de assimilação deste açúcar (entre 44 % e 47 %). Não foi observado consumo de arabinose em nenhum dos hidrolisados avaliados.

Com relação ao metabolismo de fenólicos, a levedura UFMG-CM-Y3647 apresentou melhores resultados no consumo de ácido ferúlico (entre 20 % em HAA e 68 % em HAAV) e produção de ácido vanílico, além da habilidade de metabolizar a vanilina durante as primeiras 6 h de cultivo (37 % em HAA e 62 % em HAAV), provavelmente associada com a ação da enzima vanilina desidrogenase (VDH).

A levedura UFMG-CM-Y2190 não demonstrou capacidade de metabolizar o ácido ferúlico presente em HAA e HAAV, mas foi possível observar a presença de ácido vanílico ao final dos cultivos, com  $6,97 \pm 3,35$  em HAA e  $10,49 \pm 3,64$  em HAAV. A produção do metabólito pode estar associada a capacidade da linhagem de produzir ácido vanílico a partir de outro precursor, como ácido  $p$ -coumárico, também presente no hidrolisado.

A máxima produção de ácido vanílico pela levedura *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647, obtida em 24 h, foi de  $7,43 \pm 1,57$  mg.L<sup>-1</sup> em HAA e  $11,75 \pm 1,68$  mg.L<sup>-1</sup> em HAAV, resultando em uma produtividade de  $0,31 \pm 0,07$  mg.(L.h)<sup>-1</sup> no hidrolisado ácido de arroz e  $0,49 \pm 0,07$  mg.(L.h)<sup>-1</sup> quando cultivada em hidrolisado ácido de aveia. Com a levedura UFMG-CM-

Y2190, no hidrolisado ácido de aveia, a máxima produção foi observada somente em 31 h, resultando em uma produtividade de  $0,34 \pm 0,12 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ ; utilizando o hidrolisado ácido de arroz, a produtividade calculada foi de  $0,29 \pm 0,14 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ .

Este é o primeiro trabalho utilizando linhagens de *R. mucilaginosa* em hidrolisados de arroz e aveia visando a obtenção de aromas fenólicos como metabólitos principais. Os resultados observados indicam potencial de utilização destes hidrolisados, sendo necessário primeiramente a otimização do processo de liberação de ácido ferúlico pelo método de hidrólise, com o objetivo de maximizar o rendimento e a produtividade de ácido vanílico. Além disso, os resultados sugerem que o pH possui forte influência no metabolismo das linhagens estudadas, principalmente com relação a assimilação de compostos fenólicos, sendo uma perspectiva futura a ser abordada o controle de pH em experimentos em biorreatores.



## CAPÍTULO IV

### DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, nove leveduras isoladas da biodiversidade latino-americana foram estudadas visando avaliar a obtenção biotecnológica de aromas de interesse na indústria de alimentos como vanilina, ácido vanílico e 4-vinilguaiacol. As leveduras foram preliminarmente testadas em meio sintético, contendo ácido ferúlico como principal precursor fenólico e as que apresentaram melhores resultados no consumo de ácido ferúlico e conversão em vanilina e ácido vanílico foram selecionadas.

Oito das nove linhagens avaliadas (88 %) demonstraram capacidade de metabolizar o ácido ferúlico, variando entre 6,06 % para *Debaryomyces hansenii* UFMG-CM-Y1736 até 100 % para as três linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa* avaliadas (UFMG-CM-Y3647, UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y665). A produção de ácido vanílico variou entre concentrações abaixo de 30 mg.L<sup>-1</sup> para UFMG-CM-Y665 até 130,51 mg.L<sup>-1</sup>, observada na linhagem UFMG-CM-Y2190.

Em seguida, as linhagens selecionadas de *R. mucilaginosa* foram submetidas a experimentos em meio sintético para avaliar a influência do pH do meio de cultivo na bioconversão de ácido ferúlico. Em pH inicial 5,0, foi possível observar que a produção de ácido vanílico foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a observada no experimento controle (pH 6,4), sendo as linhagens UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647 as melhores produtoras, atingindo concentrações de  $1,25 \pm 0,03$  g.L<sup>-1</sup> e  $1,14 \pm 0,02$  g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

As linhagens UFMG-CM-Y2190 e UFMG-CM-Y3647 embora tenham apresentado parâmetros cinéticos ( $Y_{VA/FA}$  e  $Q_{VA}$ ) semelhantes atingiram seus máximos de produção em tempos diferentes, sendo a máxima produção de ácido vanílico em UFMG-CM-Y3647 observada após 48 h de cultivo e em UFMG-CM-Y2190 após 58 h.

A linhagem UFMG-CM-Y665 demonstrou maiores concentrações de 4-vinilguaiacol em ambas as condições de pH avaliadas, com valores máximos de  $0,35 \pm 0,01$  g.L<sup>-1</sup> em pH 5,0 e  $0,79 \pm 0,08$  g.L<sup>-1</sup> no experimento controle (pH 6,4), indicando que a principal via de degradação do ácido ferúlico nesta linhagem segue a rota de descarboxilação não oxidativa, catalisada pela ação da enzima ácido ferúlico descarboxilase (FDC).

No experimento controle, observou-se que o acúmulo de 4-vinilguaiacol no cultivo de todas as linhagens, especialmente a linhagem UFMG-CM-Y665, acarretou em um aumento

significativo no pH do meio de cultivo ( $7.30 \pm 0.08$ ), possivelmente em função do elevado pKa deste composto (10,03). O aumento de pH também pode ter afetado a degradação de ácido ferúlico, observado pelo consumo incompleto do composto fenólico após 48 h, indicando que as enzimas FDC, vanilina desidrogenase (VDH) e outras enzimas chave da bioconversão de ácido vanílico e vanilina podem ter sido afetadas pelas mudanças de pH.

Em todos os experimentos, a formação de vanilina ocorreu em baixas concentrações, sugerindo que este composto seja um metabólito intermediário na formação de ácido vanílico por *R. mucilaginosa*, em que a presença transiente deste composto deve-se principalmente a dificuldade que alguns microrganismos apresentam de acumular vanilina no meio de cultivo em função de sua elevada toxicidade.

Em seguida, uma etapa de pré-cultivo foi realizada para investigar a influência da concentração de biomassa inicial na bioconversão de ácido ferúlico. Para isso, as linhagens foram cultivadas em meio YM modificado contendo  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose até atingirem estado estacionário, momento em que foi adicionado ácido ferúlico, em uma concentração final de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ .

A linhagem UFMG-CM-Y2190 consumiu completamente o ácido ferúlico presente no meio de cultura após 72 h, enquanto as linhagens UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-665 apresentaram percentual de consumo de 73 % e 94 %, respectivamente. Neste experimento, foi possível observar que o aumento da concentração de glicose demonstrou efeito positivo na formação de 4-vinilguaiacol em quase todas as linhagens, com destaque para a linhagem UFMG-CM-Y2190, que atingiu produção máxima de  $1,63 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$  após 55 h da adição de ácido ferúlico, resultando em uma produção volumétrica ( $Q_{4-VG}$ ) de  $29,59 \pm 1,55 \text{ mg.}(L \cdot h)^{-1}$ , três vezes maior do que o resultado obtido no experimento controle. Para a linhagem UFMG-CM-Y665, que registrou as maiores produções de 4-vinilguaiacol em experimentos anteriores, o aumento de glicose demonstrou efeito negativo na produção do metabólito, com máxima concentração observada de  $0,64 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$ .

O aumento de glicose não resultou em um efeito positivo na concentração máxima de ácido vanílico em nenhuma das linhagens avaliadas, mas foi possível observar que a concentração de açúcar influenciou significativamente a variedade de metabólitos produzidos, redirecionando o metabolismo de degradação do ácido ferúlico, com a formação de 4-vinilguaiacol e ácido vanílico em concentrações similares.

Com base nos resultados obtidos, a linhagem *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 foi selecionada para o cultivo em biorreatores, com o objetivo de avaliar a influência do controle

de pH e da aeração em cultivos submersos. Com pH 5,5 e aeração de 0,5 vvm, a formação de ácido vanílico foi favorecida entre 12 h e 24 h de cultivo, simultânea a uma maior taxa de degradação de ácido ferúlico. A máxima produção observada para o metabólito foi de  $1,20 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$  após 33 h, correspondendo a um rendimento molar de 79 %.

Nesta condição, observamos a produção de 4-vinilguaiacol em concentrações muito baixas, de aproximadamente  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  após 30 h de cultivo, diferentemente do observado para o composto em experimentos com pH livre. A baixa formação de 4-vinilguaiacol, com ácido vanílico como metabólito majoritário sugere que, nestas condições, a atividade da enzima FDC possa ter sido reprimida, e o metabolismo da linhagem *R. mucilaginosa* UFMG-CM-3647 deslocado para a via de degradação por  $\beta$ -oxidação. Além disso, após 48 h de cultivo foi observado o consumo de ácido vanílico, simultaneamente à entrada da célula em estado exponencial novamente, indicando um crescimento diáuxico, provavelmente em função da presença de hidrolases e outras enzimas que podem favorecer o metabolismo  $\beta$ -cetoadipato, responsável pela degradação de compostos aromáticos em bactérias e fungos.

Ao controlar o pH do cultivo em 6,5, observou-se que a taxa de degradação de ácido ferúlico foi significativamente afetada, acarretando no consumo incompleto do substrato, com 14 % de ácido ferúlico residual após 48 h. Durante as primeiras 24 h, o ácido vanílico foi o metabólito principal (concentração de  $0,98 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$ ), enquanto o 4-vinilguaiacol foi observado em pequenas concentrações. O aumento da concentração de 4-vinilguaiacol (concentração final de  $0,45 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu entre 36 e 48 h, quando a levedura já estava em fase estacionária, sugerindo que a atividade da enzima FDC está relacionada diretamente com a condição de pH e o estágio fisiológico das células.

Após a otimização do pH, testou-se a aeração de 2,5 vvm com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de oxigênio na produção de ácido vanílico, uma vez que condições de aeração excessivas tendem a favorecer a formação deste composto, pela estimulação de uma oxidase não específica, catalisando a reação de oxidação de vanilina em ácido vanílico.

A concentração final de ácido vanílico foi de  $1,20 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ , resultando em um rendimento molar de 78 %, não observando-se diferenças significativas quando comparada ao experimento de menor aeração (0,5 vvm). Entretanto, a produtividade volumétrica apresentou melhores resultados nesta condição, uma vez que a produção máxima do metabólito foi atingida após 30 h de cultivo, resultando em um aumento de 19 % e  $Q_{VA}$  de  $40,82 \pm 0,57 \text{ mg.}(L \cdot h)^{-1}$ .

Neste contexto, foi proposto que a rota metabólica de *Rhodotorula mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 envolve dois mecanismos distintos, modulados pelas condições de pH e

aeração do meio de cultura. Em condições levemente ácidas, a linhagem converte o ácido ferúlico em ácido vanílico como metabólito principal da reação através de  $\beta$ -oxidação, de forma semelhante ao mecanismo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, iniciando com a ativação do ácido ferúlico em feruloil-CoA pela ação da enzima FCS, que a partir de reações sequenciais é transformado em ácido vanílico, podendo ser metabolizado pela linhagem e subsequentemente convertido em metoxihidroquinona ou guaiacol. Em condições ligeiramente neutras, com pH entre 6.4 e 6.5, o ácido ferúlico é convertido via descarboxilação não-oxidativa, em uma reação catalisada pela enzima FDC, formando 4-vinilguaiacol como metabólito majoritário e ácido vanílico, cujas concentrações podem variar de acordo com outras condições do meio de cultivo, como, por exemplo, a concentração de glicose.

A partir destes resultados, avaliou-se o crescimento e a cinética de consumo de *Rhodotorula mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-Y2190 em hidrolisado de casca de arroz (HAA) e casca de aveia (HA AV), obtidos por meio de hidrólise ácida diluída, visando a obtenção de ácido vanílico e vanilina a partir do uso de resíduos agroindustriais como substrato.

O pré-tratamento ácido resultou na liberação de 0,154 g.L<sup>-1</sup> e 0,205 g.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico em HAA e HA AV, respectivamente, entretanto, a esterilização por calor úmido (autoclave) provocou a perda de 50 % a 60 % do teor inicial de ácido ferúlico, prejudicando a máxima obtenção de aromas pelos microrganismos. Para futuros experimentos, sugere-se a otimização de um processo de hidrólise para liberação de compostos fenólicos, como por exemplo, a hidrólise alcalina, com o objetivo de maximizar a concentração de ácido ferúlico no meio de cultura inicial.

Em geral, as linhagens demonstraram boa adaptação aos dois hidrolisados avaliados, não sendo observada inibição aos compostos tóxicos resultantes da hidrólise, indicando potencial de uso deste material como substrato em bioprocessos. O ácido acético, composto inibidor do metabolismo celular comum em hidrolisados lignocelulósicos, foi rapidamente consumido em todas as condições avaliadas. Com relação ao consumo de açúcares, em todas as condições a glicose foi completamente consumida, havendo variação somente do consumo de xilose, sendo a linhagem UFMG-CM-Y2190 a que apresentou melhor capacidade de assimilação deste açúcar.

Não foi possível obter a produção de vanilina a partir de nenhuma das linhagens testadas em hidrolisado de aveia e arroz. A levedura UFMG-CM-Y3647, entretanto, demonstrou maior habilidade no metabolismo de compostos fenólicos, resultando no consumo de  $20 \pm 4$  % de

ácido ferúlico em HAA e  $68 \pm 7$  % em HAAV. Também foi possível observar o consumo de vanilina em ambos hidrolisados durante as primeiras 6 h de cultivo, entre  $37 \pm 3$  % em HAA e  $62 \pm 3$  % em HAAV, resultando no surgimento de ácido vanílico no meio de cultura, em concentrações entre  $7,43 \pm 1,57$  mg.L<sup>-1</sup> e  $11,75 \pm 1,68$  mg.L<sup>-1</sup>, provavelmente resultante da ação da enzima VDH. O consumo de ácido vanílico, similarmente aos resultados obtidos em meio sintético, também foi observado a partir de 30 h, com diminuição de aproximadamente 54 % em HAAV, imediatamente após o desaparecimento de ácido ferúlico no hidrolisado.

A linhagem UFMG-CM-Y2190 apresentou menor capacidade de assimilar os compostos fenólicos presentes em ambos hidrolisados avaliados, com consumo de ácido ferúlico menor que 3 % nas duas condições avaliadas. A vanilina foi parcialmente consumida em HAA, entre  $25 \pm 2$  %, mas o mesmo comportamento não foi observado no hidrolisado ácido de aveia.

Em ambos hidrolisados houve produção de ácido vanílico pela linhagem UFMG-CM-Y2190, atingindo concentrações de  $6,97 \pm 3,35$  mg.L<sup>-1</sup> em HAA e  $10,49 \pm 3,64$  mg.L<sup>-1</sup> em HAAV. A formação de ácido vanílico neste caso pode ser em função da metabolização de outros compostos fenólicos, como ácido cafeico e  $\rho$ -coumárico, geralmente presentes no hidrolisado.

De forma similar aos experimentos em meio sintético, o efeito do pH foi também observado nos hidrolisados, em que a partir de 24 h de cultivo, após o desaparecimento do ácido acético e o aumento progressivo de pH, houve uma diminuição na taxa de consumo de ácido ferúlico nas duas linhagens estudadas.

Não houve diferença significativa entre as linhagens e entre os hidrolisados para os parâmetros de produtividade, entretanto, cabe destacar as diferenças de tempo entre os resultados, visto que a máxima produtividade da linhagem UFMG-CM-Y3647 de  $0,49 \pm 0,07$  mg.(L·h)<sup>-1</sup> em HAAV foi atingida após 24 h e, para a linhagem UFMG-CM-Y2190, a produtividade máxima de  $0,34 \pm 0,12$  mg.(L·h)<sup>-1</sup> foi observada após 31 h de crescimento.

Este é o primeiro trabalho utilizando resíduos agroindustriais lignocelulósicos para o cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* com o objetivo de produzir compostos de aroma como vanilina e ácido vanílico. Com base nestes resultados, destaca-se o potencial de uso destes hidrolisados para este fim, sendo uma das principais perspectivas futuras a otimização da hidrólise com o objetivo de maximizar a liberação de compostos fenólicos e a caracterização completa destes nos hidrolisados.

Além disso, sugere-se a otimização experimental de *R. mucilaginosa* em meio sintético e em hidrolisados, visando maximizar a obtenção de ácido vanílico e encontrar condições de pH, aeração e meio de cultura que favoreçam a formação de vanilina. De forma similar, a caracterização das enzimas ácido ferúlico descarboxilase e vanilina desidrogenase de *R. mucilaginosa*, essenciais no catabolismo de ácido ferúlico em compostos de aroma, deve ser encorajada, com o objetivo de elucidar o metabolismo de degradação de ácido ferúlico em compostos de valor agregado como vanilina, ácido vanílico e 4-vinilguaiacol.

## CONCLUSÃO

- Linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas da biodiversidade brasileira demonstraram boa capacidade de metabolizar ácido ferúlico e convertê-lo em ácido vanílico, 4-vinilguaiacol e vanilina;
- O pH inicial demonstrou impacto significativo na degradação de ácido ferúlico, uma vez que em condições levemente ácidas (pH 5,0) a produção de ácido vanílico e seus parâmetros cinéticos foram melhores;
- A adição de uma etapa de pré-cultivo em meio sintético com maiores concentrações de glicose não influenciou na produção de ácido vanílico, mas apresentou impacto significativo na variedade de metabólitos formados, modulando a rota metabólica das linhagens;
- *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 foi a linhagem que apresentou os melhores resultados de concentração, rendimento e produtividade de ácido vanílico;
- Cultivos em pH controlados em 5.5 e aeração de 2,5 vvm resultaram na melhor condição para produção de ácido vanílico, com um rendimento molar de 78 % após 30 h;
- As linhagens *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 e UFMG-CM-Y2190 apresentaram boa adaptação nos hidrolisados ácidos de casca de aveia e casca de arroz, não sofrendo inibição dos compostos tóxicos resultantes do processo de hidrólise;
- A linhagem *R. mucilaginosa* UFMG-CM-Y3647 apresentou melhor habilidade em metabolizar compostos fenólicos, especialmente ácido ferúlico, consumindo de 20 % a 68 % do teor total inicial em HAA e HAAV, respectivamente.
- O ácido vanílico foi produzido pela linhagem UFMG-CM-Y3647 em concentrações entre  $7,43 \pm 1,57 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAA e  $11,75 \pm 1,68 \text{ mg.L}^{-1}$  em HAAV, resultando em uma produtividade volumétrica de  $0,31 \pm 0,07 \text{ mg.}(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$  e  $0,49 \pm 0,07 \text{ mg.}(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ , respectivamente.

## REFERÊNCIAS

AKACHA, N. BEN; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. October, p. 675–706, 1 abr. 2015.

ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 488–495, 2013.

ASHENGROPH, M. et al. *Candida galli* strain PGO6: A novel isolated yeast strain capable of transformation of isoeugenol into vanillin and vanillic acid. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 990–998, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, jan. 2006.

BAQUEIRO-PEÑA, I. et al. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4721–4724, 2010.

BARBOSA, E. DOS S. et al. Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agroindustrial husk in solid state fermentation. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1042–1050, 2008.

BERGER, R. G. **Aroma Biotechnology**. 1st. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 1995. v. 7

BERGER, R. G. Biotechnology as a source of natural volatile flavours. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 38–43, 1 fev. 2015.

BICAS, J. L. et al. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 7–18, mar. 2010.

BOCK, L. H.; ANDERSON, J. K. Linear polyesters derived from vanillic acid. **Journal of**



**Polymer Science**, v. 17, n. 86, p. 553–558, ago. 1955.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 27 abr. 2009.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 41–44, 2000.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.

CHAKRABORTY, D. et al. Agrowaste to vanillin conversion by a natural *Pediococcus acidilactici* strain BD16. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 38, n. 13–14, p. 1823–1834, 2017.

CHAKRABORTY, D.; GUPTA, G.; KAUR, B. Metabolic engineering of *E. coli* top 10 for production of vanillin through FA catabolic pathway and bioprocess optimization using RSM. **Protein Expression and Purification**, v. 128, p. 123–133, 2016.

CHATONNET, P. et al. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 2, p. 191–202, 1993.

CHATTOPADHYAY, P.; BANERJEE, G.; SEN, S. K. Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 272–279, 2018.

COGHE, S. et al. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 602–608, 2004.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 503–511, 2005.

DA CUNHA-PEREIRA, F. et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations.

**Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4218–4225, 1 mar. 2011.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 642–645, ago. 2005.

DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1472–1476, 2005.

DI GIOIA, D. et al. Production of biovanillin from wheat bran. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 498–505, 3 set. 2007.

DI GIOIA, D. et al. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 309–316, 2011.

DIAS, J. M. C. D. S. et al. Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. **Embrapa Agroenergia**, p. 132, 2012.

DIONÍSIO, A. P. et al. **Natural flavourings from biotechnology for foods and beverages**. 1st. ed. Campinas: Woodhead Publishing Limited, 2012.

DONAGHY, J. A.; KELLY, P. F.; MCKAY, A. Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 453–456, 1 mar. 1999.

EDLIN, D. A. . et al. The biotransformation of sample phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **Neuf FEMS Microbiol**, v. 125, p. 311–316, 1995.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1082–1087, 1995.

FELIPE, L. DE O.; OLIVEIRA, A. M. DE; BICAS, J. L. Bioaromas – Perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science and Technology**, v. 62, p. 141–153, 1 abr. 2017.

FIDDLER, W. et al. Thermal decomposition of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 757–761, 1967.

GALAFASSI, S. et al. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 398–403, maio 2012.

GALLAGE, N. J.; MØLLER, B. L. Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 40–57, 5 jan. 2015.

GHOSH, S. et al. Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 131–138, 2007.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435–448, 1992.

HAINAL, A. R. et al. Lignin as a carbon source for the cultivation of some *Rhodotorula* species. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 46, n. 1–2, p. 87–96, 2012.

HANSEN, E. H. et al. De novo biosynthesis of Vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2765–2774, 2009.

HARRIS, V. et al. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 997–1006, 2008.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, v. 5, p. 64–72, mar. 2014.

HERNÁNDEZ-ORTE, P. et al. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1064–1077, 2008.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HO, C.-T. Phenolic Compounds in Food. In: HUANG, M.; HO, C.-T.; LEE, C. (Eds.). **Phytochemistry**. Washington, DC: American Chemical Society, 1992. v. 33p. 2–7.

HUA, D. et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 463–470, 15 jul. 2007.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. N. Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 23954–23958, 1993.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. **BioResources**, v. 8, n. 2, p. 3157–3176, 2013.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 60, 2015.

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 195–215, 1 jul. 1992.

KAUR, B.; CHAKRABORTY, D. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 4, p. 1353–1372, 2013.

KAUR, B.; CHAKRABORTY, D.; KUMAR, B. Phenolic biotransformations during conversion of ferulic acid to vanillin by lactic acid bacteria. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151–172, 1993.

KUMAR, P. et al. **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production** **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 15 abr. 2009.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1–24, 1997.

LEONARD, R. H.; HAJNY, G. J. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 390–395, abr. 1945.

LI, M. et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 101–107, jan. 2010.

LI, X. et al. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter* sp. Px6-4 isolated from Vanilla root. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1132–1137, 2008.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335–353, 2006.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. 2nd Editio ed. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 1990.

MAGA, J. A.; KATZ, I. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 323–372, 1978.

MARTINS, D. A. B. et al. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. In: KUMAR, S. (Ed.). . **Integrated Waste Management - Volume II**. 2. ed. Rijeka: InTech, 2011. v. Iip. 320–360.

MAST, B. et al. Lipid production for microbial biodiesel by the oleagenous yeast *Rhodotorula glutinis* using hydrolysates of wheat straw and *Miscanthus* as arbon sources. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 6, p. 955–962, 2014.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; SUDHEESH, S. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 2, p. 48–52, 1 fev. 2007.

MCMURROUGH, I. et al. Control of ferulic acid and 4-vinyl guaiacol in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, n. 5, p. 327–332, 10 set. 1996.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer: part II: flavour and threshold of 239 aroma volatiles. **Technical Quarterly Master Brewers Association of Americas**, v. 12, p. 151–168, 1975.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. **Industrial Crops and Products**, v. 25, n. 2, p. 231–237, 2007.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004a.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolyzate treatment with activated charcoal for xylitol production. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 134–139, 5 set. 2004b.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extraction and analysis of phenolics in food** *Journal of Chromatography A*, 29 out. 2004.

NARBAD, A.; GASSON, M. J. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiology**, v. 144, p. 1397–1405, 1998.

OVERHAGE, J. et al. Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (vdh) gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 820–828, 1999.

PALONEN, H. Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **VTT Publications**, n. 520, p. 3–80, 2004.

PAZ, A. et al. Fed-batch production of vanillin by *Bacillus aryabhatai* BA03. **New Biotechnology**, v. 40, p. 186–191, 2018.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, N. et al. Ferulic acid transformation into the main vanilla aroma compounds by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1677–1689, 2016.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBÜCHEL, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 296–314, 2001.

QING, Q. et al. Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of

soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. May, p. 391–397, 2017.

RAO, R. S.; RAVISHANKAR, G. A. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 3, p. 289–304, 2000.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, n. 3, p. 171–176, 2003.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from *Solanum sessiliflorum*, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 27 mar. 2013.

ROSAZZA, J. P. N. et al. Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 472–479, 1995.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 816–822, 5 set. 2005.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol. **New Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 10–16, 2010.

SALGADO, J. M. et al. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 52–61, 2012.

SMITH, B. D.; DIVOL, B. The carbon consumption pattern of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* in synthetic wine-like medium. **Food Microbiology**, v. 73, p. 39–48, 2018.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 3rd. ed. [s.l.] Elsevier, 2017.

SUN, L.-H. et al. Biosynthesis of 4-vinylguaiacol from crude ferulic acid by *Bacillus licheniformis* DLF-17056. **Journal of Biotechnology**, v. 281, p. 144–149, 10 set. 2018.

SUTHERLAND, J. B. et al. Conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by yeasts isolated from frozen concentrated orange juice. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 11, p. 1260–1262, 1 nov. 1995.

TAMANINI, C. et al. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 26, n. 2, p. 117–125, 2004.

THIBAUT, J. et al. Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 31, n. 6, p. 530–536, 1998.

TORRE, P. et al. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 500–506, 2008.

TORRES, B. R. et al. Vanillin bioproduction from alkaline hydrolyzate of corn cob by *Escherichia coli* JM109/pBB1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 3, p. 154–158, 2009.

TRAN, A. V.; CHAMBERS, R. P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 11, p. 841–845, nov. 1985.

VANDAMME, E. J. Bioflavours and fragrances via fungi and their enzymes. **Fungal Diversity**, v. 13, p. 153–166, 2003.

VERARDI, A. et al. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. In: **Bioethanol**. Calabria: InTech, 2012.

WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**, v. 63, n. 5, p. 912–914, 1 jul. 2014.

YAMADA, M. et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by *Pseudomonas putida* IE27 cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1025–1030, jan. 2007.

YU, J. et al. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological



pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 903–908, 2009.

ZHANG, G. et al. Effects of furfural and acetic acid on growth and lipid production from glucose and xylose by *Rhodotorula glutinis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 734–740, jan. 2011.

ZHAO, L. Q. et al. Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 19, p. 1505–1509, out. 2005.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. **Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review** **Food Chemistry**, 15 ago. 2008.

ZHENG, L. et al. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 5, p. 1115–1119, 2007.