ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Thamiris Guerra Giacon

**Fisiologia de bactérias lácticas contaminantes da fermentação
alcoólica na presença de inibidores lignocelulósicos.**

SÃO PAULO
2021

THAMIRIS GUERRA GIACON

Versão revisada

**Fisiologia de bactérias lácticas contaminantes da fermentação
alcoólica na presença de inibidores lignocelulósicos**

Texto apresentado à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

SÃO PAULO
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 02 de JULHO de 2021

Assinatura do autor: Thamiris Guerra Giacon

Assinatura do orientador: Thiago Olto Barro.

Catálogo-na-publicação

Giacon, Thamiris Guerra

Fisiologia de bactérias lácticas contaminantes da fermentação alcoólica na presença de inibidores lignocelulósicos / T. G. Giacon -- versão corr. -- São Paulo, 2021.

107 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Etanol 2G 2.Inibidores lignocelulósicos 3.Bactérias lácticas 4.Etanol 5.Fermentação I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

“As aptidões necessárias a uma verdadeira vocação científica são coisas preciosas e delicadas. Um tesouro raro que seria absurdo de se desperdiçar e que dele ser zelado com solicitude para que ele tenha todas as chances de florescer”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Thiago Olitta Basso pela oportunidade, paciência, empenho e orientação durante este projeto de mestrado.

Agradeço aqui também minha mãe Soraya, meu pai Sebastião e minha irmã Giovanna por todo apoio no decorrer desta jornada.

Ao meu companheiro de estrada Matheus, por me tranquilizar durante esta fase, principalmente nos tempos de pandemia. Aos meus amigos de jornada também fica o grande agradecimento: Amanda, Rafaela, Luis, Mayron, Rogéria, Martina, Keyla e Letícia.

Em especial também agradeço meus amigos do laboratório BELa: Kevy, Letícia, Helena, Silas, Priscila, Dielle além dos amigos dos laboratórios vizinhos: Tamires, Priscila, Alexandre e Rafael, por tornarem os dias mais leves e por compartilharem ideias e conhecimentos entre um café e outro.

Agradeço imensamente meu amigo de laboratório Gabriel por toda a ajuda e por transferir seus conhecimentos de cromatografia líquida.

Finalmente, agradeço à CNPq e FAPESP (2019/13826-0) pelo incentivo à pesquisa no Brasil

RESUMO

O etanol de segunda geração (2G) é produzido aproveitando-se dos resíduos agroindustriais, florestais e até mesmo lixos municipais para a obtenção da biomassa lignocelulósica, que é previamente tratada para a liberação dos açúcares fermentescíveis para a obtenção do etanol. No entanto, a fermentação desses hidrolisados lignocelulósicos ainda enfrentam muitos desafios científicos e tecnológicos. Os processos de pré-tratamento geram uma variedade de compostos que atuam como inibidores do metabolismo dos microrganismos produtores de etanol, e assim, reduzem a eficiência da fermentação. Além dos inibidores, outro problema enfrentado tanto na produção de etanol de primeira geração (1G) quanto 2G é a presença de microrganismos contaminantes, em especial as bactérias láticas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos oriundos do pré-tratamento da cana-de-açúcar sobre a fisiologia de bactérias láticas (LAB) contaminantes da fermentação alcoólica, na ausência e na presença de leveduras. Inicialmente foi avaliado o crescimento de LAB homo- e heterofermentativas na presença de diferentes açúcares relevantes à indústria de biocombustíveis. Nesses experimentos, foi observado que as maiores velocidades de crescimento foram obtidas em uma mistura de glicose e frutose, e somente as LAB heterofermentativas cresceram na presença de xilose. De uma forma geral, os compostos fenólicos e ácidos orgânicos apresentaram efeitos negativos sobre os dois tipos metabólicos de LAB, diminuindo a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max}$) em comparação ao controle, sem os inibidores. No entanto, na presença dos derivados furânicos (furfural e HMF) foi observado um estímulo do crescimento nas LAB heterofermentativas, com o aumento de $\mu_{\max}$ de $0,296\text{h}^{-1}$ do controle para $0,309\text{h}^{-1}$ na presença de HMF e $0,414\text{h}^{-1}$ na presença de furfural. Por outro lado, nas LAB homofermentativas um efeito inibitório foi observado, com consequente redução de $\mu_{\max}$ de $0,358\text{h}^{-1}$ do controle para $0,297\text{h}^{-1}$ na presença de HMF e $0,207\text{h}^{-1}$ na presença de furfural. É provável que tanto furfural como HMF atuem nas LAB heterofermentativas como aceptores externos de elétrons, reoxidando cofatores enzimáticos e consequentemente liberando-os para reações de biossíntese, resultando no aumento de $\mu_{\max}$. No experimento em frascos estáticos, além do aumento de $\mu_{\max}$, foi evidenciada a diminuição da produção de lactato e o deslocamento para a produção de acetato, que diante dos inibidores tornou-se uma via mais energeticamente favorável para as LAB heterofermentativas, com fator de conversão a acetato ($Y_{\text{ac/s}}$) variando do controle de $0,032\text{g/g}$ para $0,101\text{g/g}$ e $0,068\text{g/g}$ com HMF e furfural respectivamente. Na presença de inibidores furânicos, o co-cultivo entre LAB e uma levedura industrial de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrou que a LAB homofermentativa apresentou um efeito deletério maior sobre a levedura do que a LAB heterofermentativa, visto que a viabilidade celular da levedura foi de 50,3% no primeiro caso e de 71,1% no segundo, aparentemente pela concentração maior de ácido láctico na presença da homofermentativa. Avaliar a performance dessas bactérias contaminantes perante os compostos inibidores e açúcares gerados no pré-tratamento é de extrema importância, pois essas bactérias já são resistentes às condições do processo como temperatura, pH e alta concentração de etanol. Se, além de resistentes às condições do processo, também se mostrarem resistentes aos inibidores gerados no pré-tratamento e consumidoras de pentose, cuidados adicionais para o controle desses microrganismos deverão ser tomados nos processos de produção de etanol 2G.

Palavras-chave: etanol 2G, bactérias láticas, inibidores lignocelulósicos, processos fermentativos, biocombustíveis

ABSTRACT

Second generation ethanol (2G) is produced taking advantage of agro-industrial, forestry waste and even municipal waste to obtain lignocellulosic biomass, which is previously treated to release fermentable sugars to obtain ethanol. However, the fermentation of these lignocellulosic hydrolysates still faces many scientific and technological challenges. Pre-treatment processes generate a variety of compounds that act as inhibitors of the metabolism of microorganisms that produce ethanol, and thus reduce the efficiency of fermentation. In addition to inhibitors, another problem faced both in the production of first generation (1G) and 2G ethanol is the presence of contaminating microorganisms, especially lactic acid bacteria. In this context, the present study aimed to evaluate the impact of inhibitors present in lignocellulosic hydrolysates from pre-treatment of sugarcane on the physiology of lactic acid bacteria (LAB) contaminating alcoholic fermentation, in the absence and presence of yeasts. Initially, the growth of homo- and heterofermentative LAB was evaluated in the presence of different sugars relevant to the biofuel industry. In these experiments, it was observed that the highest growth rates were obtained in a mixture of glucose and fructose, and only heterofermentative LAB grew in the presence of xylose. In general, the phenolic compounds and organic acids showed negative effects on the two metabolic types of LAB, decreasing the maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) compared to the control, without the inhibitors. However, in the presence of furan derivatives (furfural and HMF) a growth stimulus was observed in heterofermentative LAB, with an increase in $\mu_{\max}$, from 0.296h^{-1} of the control to 0.309h^{-1} in the presence of HMF and 0.414h^{-1} in the presence of furfural. On the other hand, in homofermentative LAB an inhibitory effect was observed, with a consequent reduction in $\mu_{\max}$ from 0.358h^{-1} of the control to 0.297h^{-1} in the presence of HMF and 0.207h^{-1} in the presence of furfural. It is likely that both furfural and HMF act on heterofermentative LABs as external electron acceptors, reoxidating enzymatic cofactors and consequently releasing them for biosynthesis reactions, resulting in an increase in $\mu_{\max}$. In the experiment in static flasks, in addition to the increase in $\mu_{\max}$, the decrease in lactate production and the shift towards acetate production were evidenced, which in view of the inhibitors became a more energetically favorable route for heterofermentative LAB, with a conversion factor to acetate ($Y_{\text{ac/s}}$) varying from the control of 0.032g/g to 0.101g/g and 0.068g/g with HMF and furfural respectively. In the presence of furan inhibitors, the co-culture between LAB and an industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*, showed that homofermentative LAB had a greater deleterious effect on yeast than heterofermentative LAB, since the yeast cell viability was 50.3% in the first case and 71.1% in the second, apparently due to the higher concentration of lactic acid in the presence of homofermentative. Assessing the performance of these contaminating bacteria against the inhibitory compounds and sugars generated in the pre-treatment is extremely important, as these bacteria are already resistant to the process conditions such as temperature, pH and high ethanol concentration. If, in addition to being resistant to the process conditions, they are also resistant to the inhibitors generated in the pretreatment and consumers of pentose, additional care for the control of these microorganisms should be taken in the production processes of 2G ethanol.

Keywords: 2G ethanol, lactic acid bacteria, lignocellulosic inhibitors, fermentative processes, biofuels

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do Brasil com a área de cana-de-açúcar colhida em hectares

Figura 2. Mapa do Brasil com a concentração dos produtores de etanol

Figura 3. Redução da emissão de gases estufa comparando a gasolina com o etanol obtido através de diversas fontes

Figura 4. As diferentes rotas de obtenção dos açúcares fermentescíveis para a produção do etanol.

Figura 5. Gráfico da produtividade média de etanol em m³/hectares e a projeção para 2025 com o incremento do etanol 2G.

Figura 6. Rota de produção de etanol 1G e 2G de maneira simplificada

Figura 7. Representação esquemática do processo SHF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre separadamente da fermentação, que é dividida entre hexoses e pentoses

Figura 8. Representação esquemática do processo SSF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre em concomitância a fermentação, que é dividida entre hexoses e pentoses

Figura 9. Representação esquemática do processo SHcF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre separadamente da fermentação das pentoses e hexoses num mesmo reator

Figura 10. Representação esquemática do processo SScF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre em concomitância a fermentação, de pentoses e hexoses em um mesmo reator

Figura 11. Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica.

Figura 12. Estrutura molecular da celulose

Figura 13. Estrutura molecular exemplificada de uma hemicelulose composta por unidades de xilose e ramificações contendo grupamentos acetil e metil

Figura 14. Estrutura molecular da lignina

Figura 15. Rendimento teórico do etanol de segunda geração

Figura 16. Representação simplificada do modo de ação do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.

Figura 17. Tipos de pré-tratamento para biomassa lignocelulósica e principais exemplos

Figura 18. Formação dos componentes inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Figura 19. Aspectos negativos da contaminação microbiana durante o processo de fermentação do etanol

Figura 20. Rota metabólica EMP utilizada pelas bactérias homofermentativas

Figura 21. Rota metabólica PKP utilizada pelas bactérias heterofermentativas para metabolização de hexoses resultando no ácido láctico, etanol e ácido acético

Figura 22. Representação das etapas realizadas para o ensaio de cinética

Figura 23. Gráficos comparativos da máxima velocidade específica de cada uma das 4 bactérias lácticas (*L. plantarum* CECT 221, *L. fermentum* DSM 20391, *L. plantarum* ESALQ 4 e *L. fermentum* ESALQ 3) nos diferentes açúcares A) Sacarose, B) Glicose + Frutose, C) Glicose, D) Frutose, E) Xilose, F) Arabinose. Teste Tukey com 95% de confiança onde as médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes para cada gráfico.

Figura 24. Vias pelas quais a sacarose pode ser metabolizada em bactérias lácticas

Figura 25. Via metabólica simplificada do uso de arabinose como fonte de carbono para as bactérias lácticas

Figura 26. Curvas de crescimento na cinética de bactérias industriais homofermentativas (*L. plantarum* E4) e heterofermentativas (*L. fermentum* E3) de ácido láctico na presença de xilose

Figura 27. Esquema simplificado do metabolismo da xilose em bactérias lácticas

Figura 28. Cinética de consumo de açúcar e produção de metabólitos da bactéria láctica A) heterofermentativa (*L. fermentum*) e B) homofermentativa (*L. plantarum*) na presença de xilose como principal fonte de carbono

Figura 29. Heat map dos valores de máxima velocidade específica obtidos nos tratamentos com os inibidores em relação ao tratamento controle (sem inibidores) que representa o zero. Valores com tendência ao verde significam ensaios onde a máxima velocidade específica foi beneficiada com a presença dos inibidores. Valores com tendência ao vermelho, indicam ensaios onde a presença dos inibidores foi prejudicial ao cultivo. Bactérias lácticas homofermentativas: A (coleção), B, C, D e E (de usina). Bactérias lácticas heterofermentativas: F (coleção), G, H, I, J, K e L (de usina)

Figura 30. Mecanismo de detoxificação dos compostos furânicos

Figura 31. Efeito de compostos inibitórios na máxima velocidade específica de crescimento de bactérias industriais A) homofermentativa *L. plantarum* E4 e B) heterofermentativas *L. fermentum* E3 de ácido láctico. Teste Tukey com 95% de confiança onde as médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Figura 32. Efeito de compostos inibitórios na cinética de crescimento de bactérias industriais A) homofermentativa *L. plantarum* E4 e B) heterofermentativas *L. fermentum* E3 de ácido láctico

Figura 33. Cinética do A) consumo de glicose e produção de B) lactato na bactéria homofermentativa (*L. plantarum* E4)

Figura 34. Cinética de A) consumo de glicose e produção de B) lactato, C) acetato e D) etanol na bactéria heterofermentativa (*L. fermentum* E3)

Figura 35. Teste Tukey realizado com 95% de confiança para os fatores de conversão I) Y_{Xs} (de substrato a biomassa), II) Y_{sl} (de substrato a lactato) na bactéria homofermentativa. Para cada gráfico, as letras iguais em cada barra indicam tratamentos onde não houve diferença significativa e as letras diferentes indicam tratamentos onde houve diferença significativa.

Figura 36. Teste Tukey realizado com 95% de confiança para os fatores de conversão I) Y_{Xs} (de substrato a biomassa), II) Y_{sl} (de substrato a lactato), III) Y_{es} (de substrato a etanol) e IV) Y_{as} (de substrato a acetato) na bactéria heterofermentativa. Para cada gráfico, as letras iguais em cada barra indicam tratamentos onde não houve diferença significativa e as letras diferentes indicam tratamentos onde houve diferença significativa.

Figura 37. Variação da concentração de A) furfural e B) HMF nas bactérias homofermentativa *L. plantarum* E4 e heterofermentativa *L. fermentum* E3 no decorrer do tempo de cinética.

Figura 38. Viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos 4 tratamentos. A) *L. fermentum* + *S. cerevisiae*, B) *L. plantarum* + *S. cerevisiae*, C) *L. fermentum* + *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D) *S. cerevisiae* na presença de inibidores. Teste Tukey realizado com 95% de confiança, as letras iguais em cada barra indicam tratamentos onde não houve diferença significativa e as letras diferentes indicam tratamentos onde houve diferença significativa

Figura 39. Cinética de consumo de açúcares e produção dos metabólitos para os 4 tratamentos propostos. A) *L. fermentum* E3 + *S. cerevisiae*, B) *L. plantarum* E4 + *S. cerevisiae*, C) *L. fermentum* E3 + *L. plantarum* E4 + *S. cerevisiae* e D) *S. cerevisiae* na presença de inibidores

Figura 40. Cinética de detoxificação do A) Furfural e B) HMF para os 4 tratamentos propostos.

Figura 41. Rota de detoxificação simplificada do furfural e HMF em leveduras

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais iniciativas de etanol 2G no Brasil

Tabela 2. Perfil de formação de inibidores para tratamento ácido, alcalino e hidrólise

Tabela 3. Composição do meio MBL

Tabela 4. Listagem das cepas de bactérias lácticas utilizadas no trabalho com a classificação de seu metabolismo e local de origem

Tabela 5. Inibidores lignocelulósicos utilizados no projeto e as duas concentrações testadas baseadas em trabalhos de van der Pol et al., 2014 e Cola et al., 2020

Tabela 6. Identificação aproximada do tempo de retenção dos principais compostos analisados no detector RID (detector de índice de refração)

Tabela 7. Fatores de conversão de substrato em biomassa e do substrato em metabólitos (Y_{ls} para lactato, Y_{es} para etanol e Y_{as} para acetato) para as bactérias heterofermentativa *L. fermentum* E3 e homofermentativa *L. plantarum* E4 na presença de HMF (4g/L) e furfural (2,5g/L)

Tabela 8. Concentração final em g/L dos metabólitos e substratos em cada um dos tratamentos. A) *L. fermentum* + *S. cerevisiae*, B) *L. plantarum* + *S. cerevisiae*, C) *L. fermentum* + *L. plantarum* + *S. cerevisiae*; D) *S. cerevisiae* na presença de inibidores

Tabela 9. Comparativo de crescimento relativo com HMF e furfural em diversas concentrações obtidas de outros trabalhos na área

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. CANA DE AÇÚCAR.....	15
2.2. ETANOL COMBUSTÍVEL.....	16
2.2.1. Etanol de segunda geração (2G).....	20
2.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	26
2.3.1. Celulose.....	27
2.3.2. Hemiceluloses.....	28
2.3.3. Lignina.....	28
2.4. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	30
2.5. INIBIDORES GERADOS NO PRÉ TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	34
2.5.1. Derivados de furanos.....	35
2.5.2. Compostos fenólicos.....	36
2.5.3. Ácidos orgânicos.....	36
2.5.4. Detoxificação.....	37
2.6. CONTAMINAÇÕES NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO ETANOL.....	38
2.6.1. Bactérias láticas (LAB).....	41
2.6.2. Bactérias láticas e biocombustíveis de segunda geração.....	44
3. OBJETIVOS.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1. MEIOS DE CULTIVO.....	47
4.1.1. Meio complexo MRS.....	47
4.1.2. Meio MBL.....	47
4.2. MICRORGANISMOS.....	48
4.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES AÇÚCARES.....	49
4.4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS COM XILOSE.....	49
4.4.1. Preparo do inóculo.....	50
4.4.2. Cinética de crescimento com xilose.....	50
4.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS.....	50
4.6. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DOS INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS.....	51
4.6.1. Preparo do inóculo.....	52
4.6.2. Cinética de crescimento na presença de derivados furânicos.....	52
4.7. CO-CULTIVO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS COM LEVEDURA NA PRESENÇA DE INIBIDORES.....	53
4.8. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CÁLCULO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS QUANTITATIVOS.....	54
4.8.1. Determinação da biomassa celular.....	54
4.8.2. Determinação dos metabólitos extracelulares.....	54
4.8.3. Cálculo dos parâmetros fisiológicos.....	55
4.8.4. Estimativa de viabilidade da levedura.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57

5.1. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES AÇÚCARES.....	57
5.1.1. Crescimento em hexoses.....	59
5.1.2. Crescimento em pentoses.....	61
5.2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS EM FRASCOS ESTÁTICOS NA PRESENÇA DE XILOSE.....	63
5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS.....	66
5.3.1. Compostos furânicos.....	67
5.3.2. Ácidos orgânicos.....	69
5.3.3. Compostos fenólicos.....	70
5.4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DOS INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS.....	71
5.4.1. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}).....	71
5.4.2. Cinética do consumo de substrato e formação de produtos.....	74
5.4.3. Cinética de metabolização de compostos furânicos.....	79
5.5. CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM CO-CULTIVO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURA NA PRESENÇA DE HMF E FURFURAL.....	80
5.5.1. Viabilidade da levedura.....	80
5.5.2. Cinética de consumo de substratos e formação de produtos.....	81
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS ¹	89

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com os impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis tem aumentado cada vez mais e vem continuamente despertando o interesse para formas de energia não derivadas do petróleo que sejam tecnicamente viáveis, economicamente competitivas e causem menos impactos ao meio ambiente (Meher; Sagar; Naik, 2006). Nessa busca, o etanol surge como uma alternativa viável e financeiramente competitiva, que pode ser observado na crescente demanda mundial por este combustível.

No Brasil, a produção de etanol através da cana-de-açúcar mostra-se extremamente competitiva quando comparada a produção derivada de outros substratos como milho e beterraba. No entanto, para suprir a demanda crescente, é necessário o investimento no aprimoramento do processo que pode ser alcançado principalmente por duas rotas: através da introdução de novos cultivares de cana-de-açúcar geneticamente modificadas ou através do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o aproveitamento integral da cana no processo de produção, incluindo não apenas o caldo, mas também o bagaço para produção do biocombustível (etanol de segunda geração) (Bonomi; Maiorano; Filomena, 2008).

Uma tonelada de caldo gera aproximadamente 300 kg de bagaço (50% umidade) que tem seu potencial para geração de produtos pouco aproveitado, visto que em grande parte das usinas é utilizado nas caldeiras para a geração de energia, mas que poderia ter aplicação na produção de etanol de segunda geração (Vaz Jr, 2011). O etanol de segunda geração (2G) é produzido através do aproveitamento da biomassa lignocelulósica que é previamente tratada para a liberação dos açúcares fermentescíveis para a obtenção do etanol (Amorim et al., 2011).

Apesar dos inúmeros benefícios que podem ser obtidos, o Brasil apresenta apenas duas plantas industriais de etanol 2G operando em escala comercial, Raízen e Granbio, pois esse modelo de produção ainda enfrenta barreiras econômicas e técnicas. A barreira econômica deve-se principalmente ao custo do pré- e pós-tratamento que o material deve sofrer para possibilitar a fermentação, visto que a hidrólise da biomassa sem pré-tratamento resulta na liberação de apenas 20% dos açúcares totais, e após o pré-tratamento, pode-se chegar a 90% do total dos açúcares liberados para a fermentação (Alizadeh et al., 2005). Além disso pode-se citar também como barreira econômica o alto custo das enzimas envolvidas na

hidrólise da celulose e o baixo rendimento/produktividade das fermentações de pentoses (Sindhu, Binod e Pandey, 2016). As barreiras técnicas residem na busca de pré-tratamentos menos agressivos e que gerem menos inibidores ao metabolismo dos organismos produtores de etanol, além das inevitáveis contaminações com outros microrganismos que competem pelos nutrientes e acabam por diminuir o rendimento da fermentação (Alvira et al., 2010).

As contaminações decorrem de fatores como a qualidade da cana-de-açúcar (Solomon, 2009), o grande volume processado (Basso et al., 2014), a não esterilização do substrato (Silva-Filho et al., 2005) e ao reciclo da levedura ao final de cada fermentação (Basso et al., 2008). As bactérias produtoras de ácido lático são as mais abundantes presentes na microbiota da contaminação, destacando-se a presença de *Lactobacillus spp.*, que podem representar cerca de 60% das bactérias contaminantes. Esses microrganismos são altamente resistentes ao ambiente fermentativo, pois suportam meios com baixo pH e crescem rapidamente mesmo em altas concentrações de etanol e açúcares (Lucena et al., 2010).

Em vista do exposto, o presente estudo propõe a avaliação da fisiologia de bactérias lácticas com metabolismo heterofermentativo e homofermentativo contaminantes do processo produtivo de etanol 2G frente aos inibidores gerados no pré-tratamento. Avaliar a performance dessas bactérias contaminantes perante os compostos inibidores é de extrema importância, pois essas bactérias já são resistentes às condições de processo como temperatura, pH e alta concentração de etanol. Se além de resistentes às condições do processo, também se mostrarem resistentes aos inibidores gerados no pré-tratamento, cuidados adicionais para o controle desses microrganismos deverão ser tomados nos processos de produção de etanol 2G. Além disso, caso apresentem-se resistentes a esses inibidores, tais bactérias poderão ser úteis como plataformas microbianas, no escopo da engenharia metabólica, para produção de compostos de interesse a partir de substratos lignocelulósicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CANA DE AÇÚCAR

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e um dos maiores produtores de etanol do mundo, juntamente com Estados Unidos e China eles produzem cerca de 80% do etanol mundial (Kang, Wang e Lee, 2010). Em números, a produção nacional na safra 2021/2022 foi estimada a 628,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 27 bilhões de litros de etanol e 38,9 milhões de toneladas de açúcar, segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab,2020).

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene do gênero *Saccharum*, que se desenvolve bem em países tropicais, como Brasil, Índia e continentes como África e Pacífico Asiático. É formada basicamente por duas frações: palha e colmo. A palha corresponde às folhas verdes e secas e o colmo é a parte onde se encontram o caldo de cana (usado para a produção de açúcar e etanol) e o bagaço (resíduo da moagem) (Canilha et al., 2012).

A cana é cultivada no Brasil desde o século XVI, sendo a produção de açúcar uma das principais atividades durante o período colonial. Seu cultivo para a produção de etanol foi impulsionado apenas em meados dos anos 70, através do Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool), criado pelo governo como estratégia para driblar os baixos preços do açúcar e diminuir a dependência de petróleo importado (Kohlhepp, 2010). Com a introdução desse programa, a produção anual que estava em 600 milhões de litros em 1974, deu um salto para 10,6 bilhões de litros em menos de uma década (Leite; Leal, 2007).

Atualmente, é o terceiro cultivar mais importante em termos de área, perdendo apenas para a soja e o milho, sendo a região centro-sul responsável por mais de 90% dessa produção, (Figura 1) (Galvão et al., 2016). A indústria sucroenergética é sazonal e limitada pelo período da safra de cana-de-açúcar, variando de abril a novembro para a região Centro-Sul e de setembro a março, para região Nordeste do Brasil. A cana colhida não pode ser estocada e seu recebimento pela indústria sucroenergética deve ocorrer até 72h após a colheita, para evitar a perda de qualidade e ação de bactérias e fermentos. Dessa forma, a produção de etanol ocorre apenas 8 meses do ano, quando há oferta de cana, e nos outros 4, a indústria passa por procedimentos de manutenção (Unica, 2007). O plantio de cana-

de-açúcar é distribuído de maneira que sua colheita seja realizada durante todo o período de safra no maior ponto de acúmulo de sacarose (Amorim et al., 2011).

Figura 1. Mapa do Brasil com a área de cana-de-açúcar colhida em hectares

Fonte: IBGE, Censo Agro 2017

A cana-de-açúcar é a matéria-prima mais produtiva para o etanol, com balanço energético de 8 (unidades de energia obtida a partir do etanol produzido por unidade de energia utilizada em sua produção) comparado com seu atual rival, o milho, que não alcança balanço maior que 1,2 (Leite, 2005) e seu rendimento deve se elevar ainda mais com o desenvolvimento de variedades de cana-energia, com produtividade de etanol por hectare muito maior se comparada à das variedades tradicionais. A cana-energia é uma variedade que pode ser plantada em solos mais degradados, menos nutritivos e com menor uso de água, gerando uma cana com uma maior porção de fibras lignocelulósicas que são ideais para a produção do etanol 2G através dos açúcares monoméricos liberados após o pré-tratamento e hidrólise do material. Além disso, também pode servir para gerar eletricidade através de sua queima nas caldeiras (Lorenzi et al., 2018)

2.2. ETANOL COMBUSTÍVEL

O etanol é um dos biocombustíveis mais utilizados para transporte no mundo todo, seja ele puro ou em blends com a gasolina, representando uma alternativa forte para os combustíveis derivados de petróleo. O Brasil faz o uso do etanol desde 1925, no entanto, após a Segunda Guerra, essa alternativa em potencial foi ignorada devido ao custo de produção. O interesse foi retomado apenas na década de 1970, quando o petróleo enfrentou sua primeira grande crise. Desde então, o interesse

pela produção desse biocombustível só tem aumentado (Figura 2), pois além de não ser de origem fóssil, ele recicla o CO₂ emitido dentro do seu ciclo de produção diminuindo a emissão de gases estufa (Figura 3) (Balat, 2011).

Figura 2. Mapa do Brasil com a concentração dos produtores de etanol

FONTE: IBGE, 2017

Atualmente, cerca de 20% da matriz energética do país é suprida pela cana-de-açúcar. O etanol representa cerca de 30% do combustível líquido utilizado em veículos leves e a bioeletricidade gerada pelos resíduos representa cerca de 7% do total gerado no Brasil. O setor sucroenergético conta com o incentivo RenovaBio, que é uma Política Nacional de Biocombustíveis aprovada no final de 2017 com 3 pilares fundamentais: definir uma meta decenal de descarbonização para o setor de transporte, mecanismo de valoração do carbono que deixou de ser emitido no processo de substituição da energia fóssil por energia renovável e quantificação das emissões de gases do efeito estufa de acordo com o ciclo de vida de cada biocombustível (Cortez, 2018). Com isso, estima-se que até 2030 a produção do etanol brasileiro deve praticamente dobrar, saltando dos 29 bilhões de litros para 50 bilhões de litros (Amaral, 2018).

Figura 3. Redução da emissão de gases estufa comparando a gasolina com o etanol obtido através de diversas fontes

Fonte: adaptado PHILIPPIDIS, 2008

Cerca de 85% das destilarias brasileiras utilizam o processo de produção descontínuo (Godoy et al., 2008) denominado Melle-Boinot, que envolve basicamente três estágios principais. Esse processo tem duração de 200 a 300 dias, dependendo das condições climáticas, variedade da cana e demanda de mercado. Primeiramente, a fermentação dos açúcares é realizada em batelada alimentada em grandes fermentadores (0,5 a 3 milhões de litros). O processo tem início com a adição das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em altas densidades celulares (15% massa/volume), representando cerca de um terço do volume do fermentador. O mosto preparado de caldo de cana, melaço ou a mistura deles é adicionado ao fermentador por cerca de 4 a 6 horas. Após o término da adição de mosto, o processo segue como uma batelada convencional até que os açúcares tenham sido consumidos pelas leveduras, levando cerca de 6 a 12 horas. O processo atinge altas concentrações de etanol ao final atingindo de 8 a 12% (volume/volume) de etanol (Basso; Basso, T; Rocha, 2011).

No segundo estágio, o mosto fermentado é centrifugado e o creme resultante contendo células passa por um tratamento ácido para redução da contaminação bacteriana, retornando em seguida aos fermentadores para um novo ciclo de produção. A vantagem do reciclo celular no processo é a diminuição da necessidade de propagação intensiva do inóculo, fator que ocasiona menor desvio de substrato para produção de biomassa e consequente maior retorno financeiro. O sobrenadante da centrifugação é enviado para uma primeira etapa de separação por destilação, em que o etanol hidratado é obtido, atingindo 95% de pureza. O terceiro

estágio consiste em uma etapa de separação por desidratação, para a produção de álcool anidro com alto grau de pureza 99,5% (Amorim et al., 2011).

Um dos maiores problemas com o etanol é a disponibilidade de matéria-prima que varia dependendo da região e carrega consigo uma série de variáveis como: composição química da biomassa, práticas de cultivo, disponibilidade de terra e uso da terra, uso de recursos, balanço de energia, emissão de gases estufa, absorção de minerais do solo, uso de pesticidas, erosão do solo, contribuição para a biodiversidade, custo do transporte e do armazenamento (Balat; Balat, H; Oz, 2008).

Figura 4. As diferentes rotas de obtenção dos açúcares fermentescíveis para a produção do etanol.

Fonte: adaptado de Leite et al., 2009

O etanol pode obter o açúcar (fonte de carbono) para a fermentação de diversas matérias-primas, classificadas em três categorias (Figura 4): as fontes ricas em sacarose, como a cana-de-açúcar e a beterraba; o material rico em amido, como milho, batata e arroz; e ainda podem ser materiais lignocelulósicos, como madeira, grama, bagaço de cana e outros resíduos da agroindústria. O uso das duas primeiras categorias de matéria-prima se enquadra nos biocombustíveis de primeira geração (1G). A terceira categoria é a que tem cada vez mais sido explorada, visando uma destinação proveitosa dos resíduos agroindustriais para a produção de etanol de segunda geração (2G) complementando a produção do etanol 1G.

A Figura 5 mostra o potencial de crescimento em litros por hectare da produtividade de etanol com o incremento da tecnologia 2G, com a inserção de novas biomassas como a cana energia, por exemplo.

Figura 5. Gráfico da produtividade média de etanol em m³/hectares e a projeção para 2025 com o incremento do etanol 2G.

Fonte: adaptado de CTBE, 2015

A tecnologia de produção do etanol de primeira geração encontra-se em nível tecnológico bastante amadurecido, beirando ao esgotamento da eficiência dessa rota tecnológica. Segundo Nogueira et al. (2008), o aumento da produtividade teórica desta rota está limitado a um crescimento máximo de apenas 4%. Sendo assim, o aumento no rendimento da produção de etanol de primeira geração só poderia ser alcançado pelo aumento da área de plantio de cana-de-açúcar, podendo impactar no plantio de outras culturas. Uma alternativa seria encontrar melhorias na tecnologia de produção do etanol 2G. Estima-se que com o incremento de novas tecnologias como o etanol 2G seja possível obter um aumento de 45% da produção de etanol, sem o aumento da área de cultivo de cana (Galvão et al., 2016).

2.2.1. Etanol de segunda geração (2G)

Biocombustíveis de segunda geração são aqueles produzidos através de materiais lignocelulósicos. O etanol gerado a partir desses materiais vem se mostrando uma alternativa vantajosa do ponto de vista energético e ambiental quando comparado ao tradicional etanol de primeira geração.

Figura 6. Rota de produção de etanol 1G e 2G de maneira simplificada

Fonte: autora

O etanol de segunda geração tem despertado atenção, principalmente desde 2011, quando o BNDES e a Finep lançaram projetos de apoio à inovação nos setores sucroenergético e algumas empresas como GranBio e Raízen anunciaram programas de pesquisa e desenvolvimento desse biocombustível em escala comercial (Tabela 1) (Lorenzi; Andrade, 2019). O Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) também foi uma importante iniciativa em direção ao etanol 2G, com uma planta demonstrativa instalada em São Manoel (SP) que foi colocada a venda no final de 2020.

Tabela 1. Principais iniciativas de etanol 2G no Brasil

EMPRESA	GranBio	Raízen	CTC
Capacidade da planta (milhões litros/ano)	82	40	3
Tipo	Comercial	Comercial	Demonstrativo
Local	São Miguel dos Campos (AL)	Piracicaba (SP)	São Manoel (SP)
Custo da planta (R\$ milhões)	350	231	80
Pré-tratamento	Explosão a vapor	Explosão a vapor catalisado com ácido diluído	Explosão a vapor catalisado com ácido diluído
Matéria-prima	Bagaço e palha	Bagaço	Bagaço e palha

Fonte: Adaptado de Lorenzi et al., 2018

Somadas, essas empresas possuem plantas com uma capacidade instalada de 125 milhões de litros de etanol 2G por ano, o que torna o Brasil o quarto país do

mundo em capacidade instalada, atrás somente dos Estados Unidos, China e Canadá. Entretanto, apenas cerca de 10% desse potencial anual foi produzido até agora, e o maior problema para a operação dessas plantas ainda são dificuldades na etapa de pré-tratamento (Lorenzi; Andrade, 2019). De acordo com dados divulgados pela Agência do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), as duas usinas produziram 6,11 milhões de litros de E2G em 2019. Para chegar a estas quantias, foram processadas um total de 106,36 mil toneladas de bagaço e de palha de cana entre os dois anos, sendo 81,34 mil em 2019 e 25,03 mil em 2020.

Devido à complexidade estrutural dos materiais lignocelulósicos, o processo de produção de etanol a partir destas matérias-primas geralmente inclui as operações de: (1) pré-tratamento da biomassa, para promover a exposição das cadeias de celulose e hemiceluloses; (2) hidrólise enzimática do material pré-tratado, liberando monossacarídeos; (3) fermentação dos açúcares monoméricos disponibilizados e (4) recuperação do etanol produzido (Cardona; Quintero; Paz, 2010). A lama (slurry) derivada do pré-tratamento pode sofrer divisão (split de corrente), onde ocorre a separação da fração sólida da líquida, que poderão ser hidrolisadas e fermentadas (C5 separado de C6) ou co-fermentadas (C5 e C6 pelo mesmo microrganismo) (Rabelo, et al., 2019)

Existem diferentes rotas principais pelas quais o etanol de segunda geração pode ser obtido:

- SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*): as enzimas que clivam as ligações das hemiceluloses são produzidas separadamente e a sacarificação ocorre antes do processo de fermentação, dessa forma, ocorre a divisão da corrente de pentoses (derivadas das hemiceluloses) e hexoses (derivadas da celulose), que são fermentadas separadamente (Figura 7). A vantagem do layout SHF é que hidrólise e fermentação podem ocorrer em suas condições ótimas de operação, no entanto, consome muito tempo e dinheiro, além de ocorrer a inibição das celulasas pelos açúcares liberados na fase de hidrólise (Salehi Jouzani e Taherzadeh, 2015).

Figura 7. Representação esquemática do processo SHF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre separadamente da fermentação, que é dividida entre hexoses e pentoses

Fonte: autora

- **SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)**: sacarificação e fermentação ocorrem de forma acoplada, no mesmo reator (Figura 8) (Rastogi e Shrivastava, 2018). As enzimas são utilizadas em nível tal que os açúcares produzidos não inibam os microrganismos produtores de etanol. Em suma, apresenta vantagem sobre SHF por não ocorrer a inibição das celulasas pelo excesso de açúcares, visto que estes são imediatamente consumidos pela fermentação (Sakimoto, Kanna e Matsumura, 2017). A maior limitação de SSF é que a temperatura ótima para a ação das enzimas está acima da temperatura apropriada para o metabolismo da levedura fermentadora (Bhalla et al., 2013).

Figura 8. Representação esquemática do processo SSF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre em concomitância a fermentação, que é dividida entre hexoses e pentoses

Fonte: autora

- **SHCF (*Separate Hydrolysis and Co-Fermentation*)**: similar ao que ocorre em SHF, no entanto, não ocorre a separação das correntes C5 e C6 para a fermentação e elas ocorrem no mesmo reator (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática do processo SHcF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre separadamente da fermentação das pentoses e hexoses num mesmo reator

Fonte: autora

- SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*): similar ao que ocorre em SSF, no entanto, não ocorre a separação das correntes C5 e C6 para a fermentação e elas ocorrem no mesmo reator (Figura 10). Dessa forma tende a ocorrer a adaptação da levedura aos inibidores gerados no processo de hidrólise, além de poder também aumentar o consumo de xilose e diminuir os efeitos inibitórios causados por esta pentose (Zhang e Lynd, 2010)

Figura 10. Representação esquemática do processo SSsCF, onde a hidrólise das hemiceluloses ocorre em concomitância a fermentação, de pentoses e hexoses em um mesmo reator

Fonte: autora

- CBP (*Consolidated Bioprocessing*) todo o processo é realizado em um único tanque, desde a produção das enzimas, hidrólise das hemiceluloses e celulose, até a fermentação dos açúcares, para isso devem ser selecionados e/ou engenheirados microrganismos que suportem as condições de todos os processos envolvidos e que também sejam capazes de realizar cada uma das tarefas propostas em cada etapa (Parisutham, Kim e Lee, 2014)

No Brasil, a utilização desses materiais lignocelulósicos gerados do processamento da cana como substrato para a produção de etanol geraria um incremento substancial da produção sem a necessidade de ampliação de área plantada ou construção de novas unidades. A integração do processo 1G e 2G numa mesma planta seria possível visto que as etapas de concentração de açúcares, fermentação e destilação são semelhantes e, com isso, os investimentos seriam minimizados e a produção do etanol celulósico tornar-se-ia econômica e estrategicamente atrativa (Dias et al., 2013).

As vantagens de se fazer o uso de biomassa lignocelulósica para a produção de combustíveis é que ao contrário dos combustíveis de origem fóssil, as fontes de biocombustíveis são distribuídas de forma mais heterogênea, o que a longo prazo possibilita uma segurança no abastecimento. Além disso, o uso de biomassa lignocelulósica apresenta-se vantajoso pois é encontrado em abundância no mundo e minimiza o potencial conflito do uso de terra para a produção de alimentos versus para a produção de biocombustíveis e ainda requer menor uso de fertilizantes, pesticidas e energia (Hahn-Hagerdal, 2006). Outro fator importante que torna o etanol de segunda geração uma opção interessante é que a indústria sucroalcooleira já encontra-se em nível tecnológico bastante amadurecido, sendo assim, existe uma facilidade em integrar as duas gerações de etanol, aproveitando-se da estrutura do etanol de primeira geração (MILANEZ et al, 2012).

No entanto, os problemas técnicos atualmente enfrentados por essa abordagem estão ligados principalmente à etapa de pré-tratamento. Esses pré-tratamentos realizados em biomassas lignocelulósicas liberam em sua maioria pentoses, derivadas das hemiceluloses presente na biomassa, e as leveduras selvagens geralmente possuem preferência em fermentar as hexoses derivadas da hidrólise da celulose, principalmente. Algumas cepas de leveduras são capazes de fermentar tanto as hexoses quanto pentoses, como *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatei* e *Pachysolan tannophilus*, mas seus rendimentos são de 5 vezes menor que o da *S. cerevisiae* utilizando glicose (Solomon e Johnson, 2009; Singh e Bishnoi, 2012). Assim, as leveduras teriam que passar por modificações genéticas para que sejam capazes de fermentar as pentoses tão bem quanto as hexoses. Além disso, a etapa de pré-tratamento acarreta a geração de compostos fenólicos, derivados furânicos e ácidos orgânicos que atuam inibindo o metabolismo da

levedura, prejudicando assim o rendimento da fermentação (Hahn-Hagerdal et al., 2006; Mosier et al., 2005, Wang et al., 2013).

O grande desafio da produção economicamente viável do etanol de segunda geração reside em determinar qual a melhor forma de disponibilizar os açúcares para serem fermentados em termos de custo global, rendimento e fermentabilidade do hidrolisado. Dando os primeiros passos incertos, a produção de etanol de segunda geração ainda precisa de extensos estudos e incentivos financeiros para alcançar os avanços necessários para torná-la mais viável economicamente e competitiva ao etanol de primeira geração, principalmente no referente às enzimas utilizadas e a produção de inibidores durante o pré-tratamento (Lorenzi; Andrade, 2019)

2.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos, celulose e hemiceluloses, entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (Lee, 1997).

A biomassa lignocelulósica pode conter mais de 70% de sua composição constituída de carboidratos, que poderão servir de substrato na produção do etanol (Klinke et al., 2004). Em representação, nesses 70% estão basicamente celulose e hemiceluloses. Associada a esses carboidratos encontra-se a lignina, como mostra a Figura 11, em proporções variadas, dependendo da matéria-prima.

Figura 11. Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica.

Fonte: adaptado de Boudet et al., 2003

2.3.1. Celulose

A celulose (Figura 12) é um dos principais componentes estruturais da parede celular das plantas e fornece resistência mecânica e estabilidade química a elas, sendo o composto orgânico mais abundante do mundo (Raven et al., 2005). A celulose é um homopolímero linear de glicose, que são unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e cuja unidade de repetição é a celobiose com diferentes graus de polimerização (Jonsson; Martin, 2016). As ligações de hidrogênio intramoleculares garantem a resistência, enquanto que as intermoleculares são responsáveis por formar a fibra vegetal, alinhando moléculas de celulose paralelamente (Buckeridge et al., 2010). O difícil acesso aos açúcares presentes na celulose deve-se à presença de regiões cristalinas na cadeia de celulose e esse grau de cristalinidade está diretamente relacionado às ligações de hidrogênio (Park et al., 2010).

Figura 12. Estrutura molecular da celulose

Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009.

2.3.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses (Figura 13) são uma cadeia amorfa, ramificada e heterogênea composta de pentoses (como xilose e arabinose) e hexoses (como galactose, manose e glicose), além de grupos acetil e uranil (ácidos glucorônico e galacturônico). As hemiceluloses podem ser definidas em termos da composição da cadeia de polissacarídeos que varia de acordo com a planta, idade, tipo de tecido e condições de crescimento. Confere rigidez às fibras, pois atua realizando ligações entre lignina e as fibras de celulose (Santos et al., 2020).

Figura 13. Estrutura molecular exemplificada de uma hemicelulose composta por unidades de xilose e ramificações contendo grupamentos acetil e metil.

Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009.

2.3.3. Lignina

A lignina (Figura 14) é o terceiro componente mais abundante da biomassa lignocelulósica. É uma macromolécula polifenólica amorfo com massa molecular indefinida, sendo predominantemente composta por álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, ligados entre si por diferentes tipos de ligações (Rubin, 2008). A estrutura da lignina não é homogênea, possuindo regiões amorfas e estruturas globulares. Sua função na planta é estrutural, garantindo a impermeabilidade e resistência frente a ataques microbianos e estresse oxidativo (Carneiro, 2011).

Figura 14. Estrutura molecular da lignina

Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009.

A composição do bagaço de cana varia de acordo com os procedimentos agrícolas e industriais utilizados, como: tipo de solo, realização ou não de queimada, métodos de colheita e transporte e procedimentos de limpeza e preparo da cana-de-açúcar na indústria. Estes fatores afetam principalmente a fração de cinzas presente, visto que se relacionam diretamente com o arraste de impurezas minerais para o processo (Leite et al., 2009). No caso do bagaço e da palha de cana a proporção entre os três componentes é de aproximadamente 36-45% celulose, 25-28% hemiceluloses e 17-20% lignina em massa seca (van der Pol et al., 2014).

O bagaço é um subproduto da indústria sucroalcooleira, gerado após a retirada do caldo da cana-de-açúcar. A União da Indústria de Cana-de-Açúcar estima que uma tonelada de cana produz aproximadamente 300 kg de bagaço com 50% de umidade, ou seja, na safra de 2019/2020 onde foram colhidas 642,7 milhões de toneladas de cana, aproximadamente 180 milhões de toneladas de bagaço (base úmida) foram geradas. Este bagaço ainda possui altas concentrações de açúcares, que poderiam ser aproveitadas para a produção de etanol via rota de segunda geração (Mosier et al., 2005). Santos et al., 2012 realizaram um cálculo estequiométrico e obtiveram que 1 tonelada de bagaço de cana, composto de 40% de celulose, geraria um total de 287 L de etanol, partindo de um rendimento teórico aplicado conforme Figura 15. Considerando uma produção média de 70 toneladas de cana por hectare, e que para cada tonelada processada são gerados 140kg de bagaço e 140kg de palha, resultando em aproximadamente 9,8 ton de palha e 9,8 ton de bagaço por hectare, o rendimento total de etanol seria de aproximadamente

13 mil litros de etanol por hectare, sem a necessidade de aumentar a área de plantio (2816 L do bagaço + 2816 L da palha + 7000 L do caldo)

Figura 15. Rendimento teórico do etanol de segunda geração

Fonte: adaptado de Santos, 2012

No entanto, os três componentes, celulose, hemiceluloses e lignina, estão fortemente associados e para que possam ser utilizados devem ser empregados pré-tratamentos físicos ou químicos para haver a modificação dessa estrutura rígida e consequente liberação dos açúcares, permitindo sua hidrólise e posteriormente convertidos em etanol pelas leveduras (Alvira et al., 2010).

2.4. PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os principais objetivos do pré-tratamento são: alterar o complexo lignina-hemiceluloses – celulose e aumentar sua porosidade e área superficial, tornando-a, dessa forma, mais acessível à reação de hidrólise enzimática (Figura 16) (Niju. S; Swathika, M.; Balaji, M, 2020). A desconstrução do complexo lignina-celulose-hemiceluloses é necessária devido à sua alta robustez e característica recalcitrante que é conferida pela presença de ligações de hidrogênio e covalentes que ligam a celulose e hemiceluloses com a lignina (Niju. S; Swathika, M.; Balaji, M, 2020)

Figura 16. Representação simplificada do modo de ação do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de Hsu; Ladish; Tsao, 1980

Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos ou biológicos conforme exemplifica a Figura 17, que também podem ser aplicados em conjunto, a depender da biomassa a ser pré-tratada. Os métodos físicos aumentam a acessibilidade das enzimas à celulose por meio de mudanças na estrutura da biomassa como o aumento da área superficial, desfibrilação e algumas vezes a redução do grau de polimerização e da cristalinidade, sem alterar sua composição química (Alvira et al., 2010). Os métodos químicos podem envolver a presença de ácidos ou bases para estimular a hidrólise das ligações da lignina, promovendo a deslignificação ou então pode trabalhar com a diferença de solubilidade a diferentes solventes orgânicos para diminuir a cristalinidade da celulose e o grau de polimerização, podendo também agir hidrolisando os polissacarídeos a depender das condições de processo (Santos et al., 2020). Os métodos físicos e químicos podem ser usados de forma combinada ou não a fim de obter os melhores resultados e com custo acessível. O pré-tratamento biológico utiliza microrganismos, principalmente fungos, para solubilizar a lignina e removê-la da biomassa através da secreção de enzimas, sem necessidade de adição de produtos químicos ou altas temperaturas (Mood et al., 2013).

Figura 17. Tipos de pré-tratamento para biomassa lignocelulósica e principais exemplos.

Fonte: autora

Um pré-tratamento eficiente e economicamente viável deve visar evitar a destruição das hemiceluloses e da celulose, evitar a formação de inibidores que possam causar efeitos nas enzimas hidrolíticas ou nos microrganismos fermentativos das etapas posteriores, além de minimizar a demanda de energia e os custos (Taherzadeh; Karimi, 2008). Os métodos mais promissores para bagaço e palha de cana, com custo adequado são ácido diluído, explosão a vapor não catalisada e água quente com pH controlado (Ramirez, 2010).

O pré-tratamento com ácido diluído é o mais utilizado comercialmente por promover a remoção da lignina com alta eficiência. Esse tratamento quebra as ligações covalentes da biomassa e desmonta a estrutura lignocelulósica. Os ácidos mais utilizados são: ácido sulfúrico, nítrico e clorídrico. A maior desvantagem do tratamento ácido é a alta formação de inibidores como HMF e furfural, além de compostos fenólicos e ácidos carboxílicos. Também requer a prévia neutralização do pH antes de poder seguir para as etapas de hidrólise enzimática e fermentação (Niju, Swathika e Balaji, 2020). Além disso, sua utilização requer o uso de reatores construídos com ligas metálicas específicas para evitar a corrosão, o que encarece seu uso. Apesar das desvantagens, o tratamento ácido é visto como tecnologia promissora, pois pode ser utilizado em alta gama de biomassas resultando altos teores de açúcar (Rabelo, et al., 2019).

O pré-tratamento hidrotérmico é tido como um tratamento ambientalmente favorável pois não requer o uso de compostos químicos, além disso, o licor formado tem alta concentração de pentoses, indicando a alta recuperação das hemiceluloses. Como o pH do tratamento é mais brando, não exige a construção de reatores caros e o tratamento dos efluentes gerados não requer procedimentos complexos. Apesar disso, esse tratamento tem baixa formação de açúcares monoméricos, exigindo talvez etapas prévias com ação de enzimas para melhorar a performance, tornando o tratamento mais caro. (Nakusu, 2015).

Visando uma escala industrial, o pré-tratamento por explosão a vapor tem se apresentado o mais promissor. Durante o processo, a biomassa lignocelulósica é submetida a altas pressões de vapor saturado e temperaturas elevadas, resultando a ruptura mecânica devido à rápida redução da pressão de operação à atmosférica. O vapor de alta pressão altera a estrutura da parede celular, as hemiceluloses são hidrolisadas pela ionização da água, diminuindo o grau de polimerização, tornando-as mais solúveis. Esse pré-tratamento pode ocorrer apenas na presença de vapor saturado ou com uso de agentes químicos. A principal vantagem deste tipo de pré-tratamento é a promoção da solubilidade das hemiceluloses e a transformação da lignina, além do aumento da área superficial para entrar em contato com as enzimas, no entanto, ocorre a alta formação de inibidores advindos da degradação dos açúcares e lignina (Rabelo et al., 2019)

O tratamento por explosão com amônia (AFEX) tem se mostrado extremamente vantajoso, no entanto, seu uso está apenas restrito a escala laboratorial. AFEX promove a descristalinização da celulose e também quebra ligações da lignina com carboidratos. O que torna AFEX vantajoso é que não necessita de neutralização após o processo para a etapa enzimática e a formação de inibidores é baixa, podendo assim o hidrolisado ser direcionado a fermentação sem etapa de detoxificação. Além disso, a amônia utilizada pode ser reciclada e reutilizada. No entanto, o custo da amônia ainda representa um grande entrave para esse processo, necessitando ainda de estudos para otimização e uso em escala industrial (Zhang et al., 2020)

Apesar de adequados, os pré-tratamentos ainda precisam de estudos para otimização visando a diminuição dos custos, maximização do rendimento em açúcar

e minimização da degradação do substrato e geração de compostos inibidores (Santos et al., 2020). Se devidamente escolhido, o pré-tratamento pode reduzir significativamente a quantidade de enzimas necessárias para a sacarificação e consequentemente reduz o custo do processo (Santos et al., 2020).

2.5. INIBIDORES GERADOS NO PRÉ TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A maioria dos pré-tratamentos gera compostos inibidores aos microrganismos utilizados na fermentação do etanol. O perfil desses inibidores varia de acordo com as condições de operação do processo adotado como: temperatura, tempo, pressão, pH, presença de catalisadores e da matéria prima utilizada (Klinke; Thomsen; Ahring, 2004; Van Maris et al., 2006).

Tabela 2. Perfil de formação de inibidores para tratamento ácido, alcalino e hidrotérmico

PRÉ- TRATAMENTO	FRAÇÃO	INIBIDORES (g/kg de bagaço seco)		
		FURANOS	FENÓLICOS	ÁCIDOS
Ácido		8,76	2,75	29,33
Hidrotérmico	Líquida	21,7	1,78	75,44
Alcalino		0,08	3,37	54

Fonte: Van der Pol, et al., 2015

Figura 18. Formação dos componentes inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Fonte: Dessie et al.,2019

Existem 3 classes principais de compostos inibidores que podem surgir durante os pré-tratamentos: derivados de furanos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos como exemplificado na Figura 18. Compostos de baixa massa molecular são capazes de penetrar as membranas celulares e os de alta massa molecular têm sua ação na expressão e atividade do açúcar e nos transportadores iônicos (Palmqvist; Hahn-Hägerdal, 2000a)

2.5.1. Derivados de furanos

Os furanos são formados principalmente durante pré-tratamentos que envolvem condições de pH extremamente ácido, devido à degradação dos açúcares: 2-furfural (das pentoses) e 5- hidroximetilfurfural (HMF) (das hexoses) (Dunlop, 1948). Em pequenas concentrações, furanos podem ter um efeito positivo no crescimento celular, no entanto, quando em altas concentrações esses compostos tendem a inibir tanto o crescimento celular quanto a velocidade de produção do etanol em ação conjunta com os compostos fenólicos. Furfural e HMF inibem

diversas enzimas responsáveis pela glicólise (Modig; Liden; Taherzadeh, 2002), além de inibir a assimilação de aminoácidos contendo enxofre (Miller et al., 2009) e também serem reportados por causarem danos ao DNA, RNA e membrana plasmática (Lin; Qiao, Yuan, 2009)

2.5.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados pela solubilização da lignina ou pela oxidação ou quebra hidrolítica desse material e seu conteúdo depende do tipo de biomassa que está sendo utilizada (Almeida et al., 2007). Os mais significativos a serem formados são: 4- hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, álcool dihidroconiferílico, aldeído coniferílico, siraldeído, ácido siríngico e ácido p-cumárico (Sun; Lawther; Banks, 1996). Aldeídos fenólicos e fenilpropanóides têm suas formações favorecidas em ambientes ácidos. Dímeros de fenol também foram observados durante processos de pré-tratamento (Buchert et al., 1990). Os compostos fenólicos afetam a integridade das membranas, alterando sua capacidade de atuar como uma barreira seletiva (Palmqvist; Hann-Hägerdal, 2000a). Compostos fenólicos de baixa massa molecular possuem efeitos mais inibitórios que os de alta massa molecular, isso porque os menores conseguem penetrar mais facilmente nas células (Klinke; Thomsen; Ahring, 2004).

2.5.3. Ácidos orgânicos

A formação de ácidos orgânicos ocorre pela degradação/hidrólise da lignocelulose, originados das hemiceluloses, celulose e lignina e também pela degradação sequencial dos próprios inibidores gerados. Ácidos carboxílicos são gerados pela degradação alcalina ou desidratação dos carboidratos (Sjöström, 1991). O ácido fórmico pode ser encontrado como produto da degradação da lignina e dos açúcares presentes (Klinke et al., 2002). Ácido acético é produzido pela desacetilação das hemiceluloses. Ácido levulínico e fórmico têm origem da degradação de um produto previamente formado, o 5-HMF (Palmqvist; Hahn-Hägerdal, 2000a). Os ácidos na sua forma não dissociada são lipossolúveis e, portanto, conseguem se difundir na membrana plasmática e dentro da célula, ocorre a dissociação desses ácidos resultando na diminuição do pH intracelular. Como

resposta, para compensar essa queda de pH intracelular, ocorre uma sobrecarga na cadeia de transporte de prótons, que bombeiam prótons para fora da célula gastando energia em forma de adenosina trifosfato (ATP), o que acarreta na diminuição da taxa de crescimento e rendimento da biomassa (Pampulha; Loureiro-Dias, 2000, Russel, 1992).

2.5.4. Detoxificação

Individualmente esses compostos inibidores podem não apresentar um efeito significativamente negativo na fermentação, mas a combinação dos diversos inibidores gerados pode gerar grandes prejuízos, diminuindo drasticamente o rendimento e viabilidade da levedura. Por isso, torna-se uma etapa necessária a remoção desses compostos para uma fermentação eficiente, uma vez que evitar a formação de subprodutos inibidores não é uma tarefa fácil e tampouco economicamente viável em escala industrial (Chandel; Da Silva; Singh, 2013).

Existem três tipos de abordagens diferentes para minimizar a presença de inibidores nos hidrolisados lignocelulósicos: 1) evitar a formação de inibidores durante o pré-tratamento, 2) detoxificar o hidrolisado antes da hidrólise e da fermentação, 3) desenvolver espécies de microrganismos capazes de resistir a esses inibidores (Tahezadeh et al., 2000). A detoxificação tem como proposta transformar esses inibidores em compostos inativos ou diminuir sua concentração no ambiente fermentativo. Vários tipos de estratégias de detoxificação foram aplicadas para remediar os inibidores da fermentação, como física (detoxificação mediada por membrana, evaporação), química (overliming, neutralização, resinas de troca iônica, coluna de carvão ativado e extração com solventes), biológica (microbiana e enzimática) e detoxificação microbiana *in situ*.

Os métodos biológicos de detoxificação estão em demanda devido à sua simplicidade, condições de trabalho mais amenas que evitam o uso de produtos químicos, menor frequência de reações colaterais e menor consumo de energia (Parawira; Tekere, 2011). No entanto, suas limitações incluem tempo de reação lento, especificidade do inibidor e perda de açúcares fermentáveis, o que os torna pouco atraentes para as biorrefinarias (Tian et al., 2009).

De acordo com avaliações econômicas, o custo dessa detoxificação pode representar cerca de 20% do custo de produção do etanol (Von Sivers et al., 1994) e por isso torna-se importante o estudo de alternativas que tornem esse processo mais barato como a seleção de microrganismos resistentes ou habilidade de decompor esses inibidores e posteriormente sua aplicação na detoxificação *in situ* ou até mesmo fazer o uso de engenharia genética para tornar as leveduras mais resistentes a esses compostos (Bernardes, 2011).

2.6. CONTAMINAÇÕES NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO ETANOL

Devido à enorme escala do processo de produção de etanol, as condições assépticas são impossíveis de serem alcançadas, sendo comum o aparecimento de uma microbiota de contaminantes constituída de leveduras, fungos, vírus e bactérias (Costa et al., 2015). As características do processo e da matéria-prima acabam por favorecer a presença desses contaminantes na dorna (Brexó; Sant'Ana, 2017). Essas contaminações são geralmente controladas pelo tratamento com ácido sulfúrico diluído entre os ciclos ou até mesmo com a utilização de antibióticos industriais como penicilina, tetraciclina e virgiamicina (Narendranath, 2003)

Em dornas de fermentação, a contaminação pode ocorrer de forma direta ou indireta. No modo direto, os microrganismos contaminantes são provenientes de materiais adicionados ao fermentador, como mosto, inóculo ou através da formação de aerossóis. No modo indireto, os microrganismos contaminantes encontram-se nas linhas de transferência ou de água, formando biofilmes nas tubulações, tornando-se um foco constante de contaminação do processo (Muthaiyan; Limayem; Ricke, 2011).

A contaminação bacteriana acarreta diversos problemas durante a fermentação:

- a) Competição por açúcares: as bactérias acabam por competir pelo açúcar presente no meio causando o desvio do substrato que seria utilizado para a produção de etanol, podendo levar a uma perda de 1,5 a 5% do rendimento dependendo das condições da fermentação (Narendranath, 2003);

- b) Produção de metabólitos: as bactérias ao consumirem o açúcar produzem metabólitos característicos de seu metabolismo, como o ácido lático e outros ácidos orgânicos, que podem inibir o crescimento da levedura e levam a diminuição de sua viabilidade e redução do rendimento de produção de etanol;
- c) Floculação: a presença das bactérias acentua a formação de agregados pelas leveduras, o que ocasiona perdas de células de levedura no fundo das dornas e dificuldade na operação das centrífugas devido ao entupimento dos bicos (Yokoya; Olivia-Neto, 1991)
- d) Formação de gomas que aumentam a viscosidade do meio e podem causar o entupimento de canos e equipamentos (Brexó; Sant'Ana, 2017).

Em contraste, a levedura pode ter uma interação positiva com a bactéria, ajudando seu crescimento através da produção e excreção de fatores de crescimento, como aminoácidos (Ponomarova et al., 2017) e também pela quebra da sacarose em açúcares fermentescíveis pelas bactérias, retroalimentando as contaminações (Leroi; Pidoux, 1993) e favorecendo as bactérias principalmente nos estágios finais do ciclo fermentativo devido à autólise das células de levedura (Yokoya; Olivia-Neto, 1997)

Figura 19. Aspectos negativos da contaminação microbiana durante o processo de fermentação do etanol

Fonte: Adaptado de Brexó; Sant'Ana, 2017

Estima-se que uma contaminação bacteriana de 10^8 células/mL ocasionam uma perda média de 20 mil litros de etanol por dia em uma destilaria de médio porte (Amorim et al., 2011). Avalia-se que nas dornas brasileiras encontram-se valores

entre $6,0 \times 10^5$ a $8,9 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. As bactérias mais abundantes nas dornas de fermentação industrial de etanol são as bactérias produtoras de ácido láctico. Dentre as bactérias lácticas, destaca-se a presença da ordem *Lactobacillales*, particularmente dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* e principalmente *Lactobacillus* que possui diversas espécies capazes de crescer em concentrações de etanol acima de 10% (v/v) (Narendranath et al., 1997; Lucena et al., 2010).

Gallo et al. (1990) em estudo de destilarias do sudeste brasileiro, identificou que 98,52% das bactérias contaminantes isoladas eram do grupo das Gram Positivas, sendo 59,75% do gênero *Lactobacillus* e 26,58% *Bacillus*. Em trabalho desenvolvido por Lucena et al. (2010), foi realizada a análise da microbiota presente em dornas de fermentação do Nordeste brasileiro e os resultados obtidos confirmaram a predominância do gênero *Lactobacillus* com destaque para *L. fermentum* e *L. vini*. Bontatelli et al., (2017) estudaram as contaminações em uma destilaria a base de cana no Sudeste e obtiveram de 92 a 99% de predominância do gênero *Lactobacillus*. Firmino et al. (2019) mostrou que o gênero *Lactobacillus* em uma destilaria de milho nos Estados Unidos pode representar cerca de 80% das contaminações por bactérias existentes na dorna, sendo *L. delbrueckii* e *L. reuteri* majoritariamente encontradas. De Oliveira Lino et al. (2021) demonstrou que fermentações acima de 32°C privilegiam espécies de *L. amylovorus* e *L. fermentum*, sendo esta última responsável por causar impacto negativo na fermentação devido ao seu perfil metabólico heterofermentativo.

Existe um grande interesse no estudo dessas bactérias, pois além de crescerem rapidamente, são tolerantes aos inúmeros fatores de estresse presentes na produção do etanol como as altas concentrações do produto, altas concentrações de sal, pH e temperatura extremos (Bosma; Forster; Nielsen, 2017), e até tolerantes a alguns dos compostos inibidores gerados no pré-tratamento (van der Pol et al., 2016). Além disso, a maioria das bactérias lácticas (LAB) são capazes de usar tanto as hexoses quanto as pentoses derivadas da lignocelulose (Boguta et al., 2014). Em estudo realizado por Schell et al. (2007) foi identificada a presença de bactérias contaminantes capazes de usar arabinose como fonte de açúcar, fonte que não é utilizada pelas leveduras para a fermentação do etanol, causando uma produção de ácido acético e ácido láctico que possuem efeito deletério para as leveduras.

2.6.1. Bactérias lácticas (LAB)

As bactérias lácticas são microrganismos Gram positivos, anaeróbicos facultativos ou aerotolerantes, não esporulantes e fermentam uma grande variedade de fontes de carbono, tendo como principal produto final o ácido láctico. São microrganismos fastidiosos, adaptados a substratos organicamente complexos, requerendo além dos carboidratos, a presença de nutrientes complexos para seu desenvolvimento como: aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas, ácidos graxos e sais (De Angelis; Gobbetti, 2016) e obtêm energia através da fosforilação a nível de substrato metabolizando o ácido láctico através da lactato desidrogenase, uma enzima NAD-dependente.

Tradicionalmente, o ácido láctico tem sido usado na indústria de alimentos como conservante, no entanto seu potencial tem se estendido a indústria de cosméticos como emulsificante e hidratante, como solvente e também como precursor do bioplástico (PLA). As bactérias lácticas são encontradas em diversos tipos de habitats, desde solo, plantas, adubo, carnes, água, esgotos, restos de alimentos, na indústria alimentícia (produção de laticínios como: queijos, iogurtes e manteiga) e em fermentações alcoólicas (produção de etanol e bebidas destiladas). Além desses habitats, as bactérias lácticas podem ser encontradas na cavidade oral, trato digestivo e vaginal humano, e podem trazer benefícios para estes ecossistemas (Santos, 2012).

As bactérias lácticas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com a maneira que metabolizam os açúcares. As bactérias obrigatoriamente homofermentativas usam a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para a metabolização dos açúcares e o piruvato formado é reduzido, formando ácido láctico como mostra a Figura 20. Essas bactérias possuem a enzima aldolase, no entanto não possuem a fosfoctolase, o que as torna incapazes de fermentar pentoses (Kang; Korber; Tanaka, 2013). Cada mol de açúcar metabolizado gera dois de ácido láctico, produzindo dois ATP. Como via alternativa de regeneração do NAD⁺, as bactérias homofermentativas possuem a enzima manitol-1-fosfato desidrogenase, que reduz a frutose-6-fosfato a manitol-1-fosfato, reoxidando o NADH para ser utilizado em outras rotas metabólicas. O manitol também pode ser consumido, através da fosforilação a manitol-1-fosfato e conversão à frutose-6-fosfato e posterior inserção na via glicolítica (Wisselink et al., 2002).

Figura 20. Rota metabólica EMP utilizada pelas bactérias homofermentativas

Fonte: Adaptado de Kandler, 1983

As bactérias heterofermentativas obrigatórias fazem a conversão do açúcar através da via fosfocetolase (PKP), resultando em uma mistura equimolar de ácido láctico e etanol/ácido acético (Figura 21) (Kandler, 1983). Em anaerobiose, as heterofermentativas são capazes de utilizar a frutose como receptor de elétrons para a reoxidação do NADH através da enzima manitol desidrogenase (Colombi et al., 2017). As heterofermentativas facultativas apresentam as tanto aldolase quanto fosfocetolase, dessa forma, são capazes de fermentar tanto hexoses quanto pentoses e na presença de glicose as enzimas da via do fosfogluconato são reprimidas, alterando seu metabolismo para homofermentativo (De Angelis; Gobetti, 2016).

Figura 21. Rota metabólica PKP utilizada pelas bactérias heterofermentativas para metabolização de hexoses resultando no ácido láctico, etanol e ácido acético

Fonte: Adaptado de Kandler, 1983

As bactérias lácticas podem ser encontradas nas formas de cocos ou bacilos e crescem em ampla faixa de temperatura, sendo entre 30 e 40°C a temperatura ótima, além de suportar valores extremos de pH (entre 2 e 3) com o pH ótimo entre 5,5 e 6 (Narendranath, 2003). As bactérias lácticas têm sido extensamente utilizadas pelo homem devido a sua grande variedade de produtos metabólicos, pela sua versatilidade metabólica e por suportarem condições extremas dos processos industriais. Os *Lactobacillus* apresentam hoje cerca de 150 diferentes espécies (Boguta et al., 2014) com um amplo painel de atividade metabólica que vem cada dia mais aumentando suas aplicações, desde o tradicional uso na indústria alimentícia até a produção de combustíveis e farmacêuticos (Bosma; Forster; Nielsen, 2017).

2.6.2. Bactérias láticas e biocombustíveis de segunda geração

As bactérias láticas se apresentam com uma ampla lista de propriedades que as tornam interessantes para estudos, tais como a alta tolerância a pH, a altas concentrações de etanol, a altas temperaturas e concentração de sais elevadas, além disso, por ter seu genoma pequeno, existe a vantagem desses microrganismos de serem modificados por tecnologia do DNA recombinante com menor interferência de fatores inesperados ou por rotas metabólicas competitivas (Bosma; Forster; Nielsen, 2017). G-Alegria et al. (2004) sugeriram o emprego de *Lactobacillus plantarum* como alternativa para produção de etanol por sua alta tolerância a baixos pH e alta concentração de etanol (acima de 13%v/v), demonstrando o potencial dessas bactérias para processos mais robustos. Vinary-Lara et al. (2016) sugeriram *Lactobacillus casei* como um candidato promissor visto que possui alta tolerância a diversos alcoóis e também a inibidores lignocelulósicos e atualmente vem sendo estudada sua genética para a produção de etanol. A produção de outros alcoóis também vem sendo estudada, como o butanol, que foi observada por Liu et al. e Berezina et al. (2010) através da alteração de rotas metabólicas.

Boguta et al. (2014) analisaram diversas espécies de bactérias láticas, avaliando propriedades importantes para a indústria de bioconversão de material lignocelulósico em bioprodutos. Foram avaliadas as capacidades de utilizar xilose e arabinose (resultantes da hidrólise das hemiceluloses), a resistência aos inibidores gerados no pré-tratamento e a performance diante das altas concentrações de ácido durante o processo de fermentação.

O estudo do efeito dos inibidores tem sido extensivamente estudado em cepas produtoras de etanol como *Saccharomyces cerevisiae* (Taherzadeh et al. 2000, Cola et al., 2020) e *Zymomonas mobilis* (Delgenes et al. 1996,) no entanto em bactérias láticas esses estudos estão tomando mais forma nos últimos anos. Van der Pol et al. (2016) fez o estudo de 5 cepas de bactérias láticas na presença de 12 inibidores gerados do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica visando a produção de ácido lático através da via de segunda geração, identificando os compostos furânicos como os inibidores chave do pré-tratamento. Gulbet et al. (2020) avaliou o efeito de ácido acético, fórmico e levulínico, bem como de HMF,

furfural, e compostos fenólicos, avaliando as concentrações inibitórias para *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 and *Lactococcus lactis* JCM 7638 em comparação com a cepa adaptada *Lactobacillus brevis* IGB 1.29. Além disso, Gubelt avaliou o efeito do pH no poder inibitório dos compostos gerados pelo pré-tratamento e observou que esse parâmetro é mais influente nos ácidos orgânicos, o pH mais baixo tende a provocar efeitos mais deletérios pois dessa forma os ácidos encontram-se na forma dissociada e não conseguem adentrar a célula para causar maiores danos.

3. OBJETIVOS

Objetivo:

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de inibidores oriundos do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica sobre a fisiologia de bactérias lácticas contaminantes da fermentação alcoólica, na ausência e na presença de leveduras.

Etapas:

A) Caracterização fenotípica da diversidade bacteriana (incluindo cepas isoladas do processo industrial de produção de etanol e cepas laboratoriais) sob diferentes fontes de carbono (sacarose, xilose, arabinose, entre outras) em pequena escala (microplacas e frascos);

B) Caracterização fenotípica da diversidade bacteriana na presença de diferentes inibidores lignocelulósicos, tais como furanos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, em pequena escala (microplacas e frascos), e em diferentes concentrações;

C) Co-cultivo de bactérias lácticas com leveduras industriais na presença de inibidores lignocelulósicos, para avaliação do efeito na fermentação em escala de laboratório do processo de etanol 2G.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MEIOS DE CULTIVO

4.1.1. Meio complexo MRS

O meio De Man Rogosa e Sharpe (MRS) é um meio complexo e rico utilizado para cultivo de lactobacilos (De Man; Rogosa; Sharpe, 1960). Esse meio leva em sua composição: glicose 20 g/L, peptona 10g/L, extrato de carne 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L,, acetato de sódio 5 g/L, polisorbato 80,1 g/L, fosfato de potássio 2 g/L, citrato de amônio 2 g/L, sulfato de magnésio 0,2 g/L e sulfato de manganês 0,05 g/L. Após preparo com água deionizada, o pH do meio foi ajustado para 6 com KOH e foi esterilizado por calor úmido em autoclave 121°C durante 30 minutos. No presente trabalho o meio complexo MRS foi utilizado para proporcionar o crescimento dos lactobacilos em inóculos e para o preparo das culturas estoque.

4.1.2. Meio MBL

Para melhor evidenciar as respostas dos microrganismos frente às diferentes condições de cultivo e proporcionar maior facilidade na alteração do meio para futuros experimentos, os ensaios foram realizados em meio MBL (Basso et al., 2014), contendo os componentes descritos na Tabela 3, com pH ajustado para 6 com KOH e esterilizado em autoclave 121°C durante 30 minutos.

Tabela 3. Composição do meio MBL

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20
Extrato de levedura	5
Peptona	5
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄	0,2
MnSO ₄	0,01

Fonte: Basso et al., 2014

4.2. MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados no projeto foram obtidos da coleção do Laboratório de Bioprocessos (BELa) da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Foram utilizadas cepas de bactérias homofermentativas (*Lactobacillus plantarum* CECT 221) e heterofermentativas (*Lactobacillus fermentum* DSM 20391) de coleção, bem como espécies isoladas do mosto fermentado de usinas de etanol de primeira geração de cidades do interior de São Paulo, listadas e codificadas na Tabela 4.

As cepas A e G foram cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. A cepa B foi cedida pelo Dr. Bruno Labate. As cepas C, H e I foram cedidas pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Basso (Esalq-USP, Brasil). As cepas D, E e L foram isoladas pela mestre Priscila Cola (Universidade de São Paulo). As cepas F, J e K foram cedidas por Felipe Senne de Oliveira Lino.

Tabela 4. Listagem das cepas de bactérias lácticas utilizadas no trabalho com a classificação de seu metabolismo e local de origem

Metabolismo	Código	Cepa	Isolado
Homofermentativo	A	<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 221	Indústria alimentícia
	B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Indústria cervejeira
	C	<i>Lactobacillus plantarum</i> ESALQ 4	Fermentação cana
	D	<i>Lactobacillus paracasei</i> LAB 4	Fermentação cana
	E	<i>Lactobacillus paracasei</i> LAB 5	Fermentação cana
Heterofermentativo	F	<i>Lactobacillus fermentum</i> DSM 20391	Cavidade oral humana
	G	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23272	Intestino de rato
	H	<i>Lactobacillus fermentum</i> ESALQ 3	Fermentação cana
	I	<i>Lactobacillus fermentum</i> ESALQ 5	Fermentação cana
	J	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1L-6-MRS	Fermentação cana
	K	<i>Lactobacillus fermentum</i> 3L-2-M17	Fermentação cana
	L	<i>Lactobacillus paracasei</i> LAB 2	Fermentação cana

Fonte: autora

As cepas de bactérias foram submetidas ao crescimento em 25 mL de meio MRS com glicose 20 g/L em tubos do tipo cônico de 50 mL, incubadas a 37°C durante 24h. Do volume final obtido, de forma asséptica, foi adicionado 20% em relação a ele de glicerol visando proporcionar crioproteção às bactérias. Essa

mistura foi distribuída em tubos criogênicos de 2 mL devidamente catalogados para serem estocadas em ultrafreezer a -80°C.

4.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES AÇÚCARES

Foram avaliados os crescimentos das bactérias lácticas homo e heterofermentativas, de coleção e isoladas de usina, tendo como substrato diferentes açúcares. Para isso, foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo chato com 200 µL de meio de cultivo MBL, com a adição de 20 g/L dos seguintes açúcares: sacarose, xilose, arabinose, frutose, glicose e combinação de glicose e frutose. O meio MBL foi esterilizado separadamente dos açúcares, em autoclave, para evitar a degradação pelo calor, como ocorre com a sacarose. As soluções de cada açúcar foram esterilizadas em membrana 0,22µm e posteriormente foram adicionadas ao meio em fluxo laminar.

Os testes foram realizados em triplicata na temperatura de 37°C sem agitação. As bactérias lácticas utilizadas foram *L. plantarum* CECT 221, *L. fermentum* DSM 20391, *L. plantarum* ESALQ 4 e *L. fermentum* ESALQ 3, abrangendo uma bactéria láctica de cada metabolismo de coleção e isolada da indústria. O inóculo foi preparado em um tubo cônico de 50 mL contendo 25 mL do meio MRS, em que foi acrescentado 200µL da LAB em estoque. Esse inóculo permaneceu em crescimento a 37°C durante 24 h. Desse inóculo, foi centrifugado (10000 rpm durante 10 min) um volume suficiente para a obtenção de uma densidade ótica (DO₆₀₀) inicial de 0,5, medida em espectrofotômetro com comprimento de onda 600 nm.

A biomassa centrifugada foi ressuspensa em 1 mL de meio MBL com os diferentes açúcares, que serviram para alimentar os poços da microplaca. Os cultivos foram monitorados pelo leitor de placas Tecan Infinite Pro 200, que realizou a leitura da DO₆₀₀ em intervalos de 20 minutos, durante 24h de cultivo sem agitação, permitindo a obtenção das curvas de crescimento e consequentemente da máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}).

4.4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS COM XILOSE

Tendo em vista que a xilose é a pentose predominante na biomassa lignocelulósica e o segundo carboidrato mais abundante na natureza, as duas

bactérias lácticas industriais (previamente selecionadas na etapa anterior de estudo, levando-se em conta o metabolismo e seu uso no grupo de pesquisa) sendo uma bactéria homofermentativa (*L. plantarum* ESALQ 4) e uma bactéria heterofermentativa (*L. fermentum* ESALQ 3), foram analisadas em cultivos em frascos sem agitação, para avaliar o crescimento e outros parâmetros adicionais na presença da xilose como o consumo do açúcar e a produção de ácido láctico.

4.4.1. Preparo do inóculo

Os inóculos para cada ensaio foram preparados em tubos cônicos de 50 mL contendo 25 mL do meio MRS, nos quais foram acrescentados 200µL da bactéria láctica em estoque. Os tubos foram então incubados em condição estática a 37°C durante 24 h.

4.4.2. Cinética de crescimento com xilose

Para o ensaio com xilose, foi utilizado o meio MBL, com xilose na concentração 20g/L. O inóculo teve sua DO₆₀₀ medida e a depender da concentração de biomassa de cada bactéria, um volume suficiente de inóculo foi centrifugado 10000 rpm por 10 minutos para ser ressuspensionado no meio de cinética, a fim de que cada ensaio tivesse como início uma DO₆₀₀ de 0,5. O experimento de cinética foi conduzido em tubos de fundo cônico de 50 mL, contendo 30 mL do meio MBL com xilose. Os cultivos foram realizados em triplicata a 37°C sem agitação, com alíquotas de retiradas de hora em hora até as 8h de cultivo e no tempo 24h, para avaliação da DO₆₀₀, do consumo de açúcares e produção de metabólitos extracelulares através de cromatografia líquida.

4.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS

Os inibidores lignocelulósicos foram testados individualmente em diferentes concentrações baseadas em dados da literatura (van der Pol et al., 2014, Cola et al., 2020) conforme indicadas na Tabela 5. Tais cultivos foram realizados para todas as bactérias lácticas listadas na Tabela 4. Para isso, foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo chato com 200 µL de meio de cultivo MBL, com a adição dos inibidores nas respectivas concentrações e temperatura de 37°C. Os testes foram

realizados em triplicata e contando com a presença de um controle sem a presença de inibidores e com brancos sem adição de bactérias.

O inóculo foi preparado em um tubo cônico de 50 mL contendo 25 mL do meio MRS, em que foi acrescentado 200µL da LAB em estoque. Esse inóculo permaneceu em crescimento a 37°C durante 24 h. Desse inóculo, foi centrifugado (10000 rpm durante 10 min) um volume suficiente para a obtenção de uma densidade ótica (DO_{600}) inicial de 0,8, medida em espectrofotômetro com comprimento de onda 600 nm. A biomassa centrifugada foi ressuspensa em 1 mL de meio MBL com ou sem inibidor que serviram para alimentar os poços da microplaca. Os cultivos foram monitorados pelo leitor de placas Tecan Infinite Pro 200, que fez a leitura da DO_{600} em intervalos de 15 minutos, durante 24h de cultivo sem agitação, permitindo a obtenção das curvas de crescimento e consequentemente da máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}).

Tabela 5. Inibidores lignocelulósicos utilizados no projeto e as duas concentrações testadas

INIBIDOR	CONCENTRAÇÃO *(g/L)	
	BAIXA	ALTA
Ácido acético	3	7
Ácido levulínico	3	15
Ácido p-cumárico	0,41	0,82
HMF	2	4
Ácido Fórmico	0,6	2
Furfural	1,5	2,5

*baseadas em trabalhos de van der Pol et al., 2014 e Cola et al., 2020

Fonte: autora

4.6. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DOS INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS

Após realizado o *screening* inicial (seção 4.5), duas bactérias lácticas industriais representando os dois tipos metabólicos, sendo uma bactéria homofermentativa (*L. plantarum* ESALQ 4) e uma bactéria heterofermentativa (*L. fermentum* ESALQ 3), foram analisadas em cultivos em frascos estáticos, para obtenção de parâmetros fisiológicos adicionais.

4.6.1. Preparo do inóculo

Os inóculos para cada ensaio foram preparados em tubos cônicos de 50 mL contendo 25 mL do meio MRS, nos quais foram acrescentados 200µL da bactéria láctica em estoque. Os tubos foram então incubados em condição estática a 37°C durante 24 h.

4.6.2. Cinética de crescimento na presença de derivados furânicos

Para os testes com inibidores foram selecionadas as maiores concentrações de cada inibidor para realização do experimento, baseadas no *screening* previamente realizado. Devido aos resultados interessantes obtidos pelo *screening*, foram testados apenas os derivados furânicos (HMF 4 g/L e furfural 2,5 g/L).

O inóculo teve sua DO_{600} medida e a depender da concentração de biomassa de cada bactéria, um volume suficiente de inóculo foi centrifugado 10000 rpm por 10 minutos para ser ressuspendido no meio de cinética, a fim de que cada ensaio tivesse como início uma DO_{600} de 0,5. O experimento de cinética foi conduzido em tubos de fundo cônico de 50 mL, contendo 30 mL do meio MBL com os inibidores e o controle, onde não foi adicionado inibidores. Os cultivos foram realizados em triplicata a 37°C sem agitação, com alíquotas retiradas de hora em hora até 10h de cultivo e no tempo 24h, para avaliação da DO_{600} , do consumo de açúcares e produção de metabólitos extracelulares através do HPLC.

Figura 22. Representação das etapas realizadas para o ensaio de cinética

Fonte: autora

4.7. CO-CULTIVO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS COM LEVEDURA NA PRESENÇA DE INIBIDORES

Visando investigar os efeitos dos inibidores na presença dos principais microrganismos presentes na fermentação do etanol, foi realizada uma cinética das bactérias lácticas na presença dos inibidores e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura utilizada foi obtida dos bancos de estoque do laboratório de Bioprocessos (BELa), sendo escolhida a *S. cerevisiae* PE-2, isolada da usina da Pedra, no interior de São Paulo.

Os ensaios foram realizados em meio MBL tendo glicose como fonte de açúcar com a adição de furfural (0,5g/L) e HMF (1,5g/L). As concentrações dos inibidores foram diminuídas da etapa de *screening* por considerar que poderia haver um efeito sinérgico entre os dois inibidores, causando um efeito aditivo negativo nos cultivos. Foram realizadas 4 variações do experimento:

- A) *L. fermentum* E3 + *S. cerevisiae* PE-2
- B) *L. plantarum* E4 + *S. cerevisiae* PE-2
- C) *L. fermentum* E3 + *L. plantarum* E4 + *S. cerevisiae* PE-2
- D) *S. cerevisiae* PE-2

Os inóculos tiveram sua DO_{600} medida e a depender da concentração de biomassa de cada microrganismo, um volume suficiente de inóculo foi centrifugado 10000 rpm por 10 minutos para ser ressuspensionado no meio de cinética, a fim de que cada ensaio tivesse como início uma DO_{600} de 0,5 para a bactéria e 0,7 para levedura.

O experimento de cinética foi conduzido em tubos de fundo cônico de 50 mL, contendo 30 mL do meio MBL com inibidores. Os cultivos foram realizados em triplicata a 32°C sem agitação, com alíquotas retiradas a cada 4 h para o acompanhamento da população de leveduras por contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Além disso, as alíquotas foram utilizadas também para acompanhamento do consumo dos açúcares e produção de metabólitos extracelulares por HPLC.

4.8. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS E CÁLCULO DOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS QUANTITATIVOS

4.8.1. Determinação da biomassa celular

Tanto nos cultivos em microplaca quanto nos cultivos em frasco estáticos, a biomassa celular foi medida indiretamente, através da determinação da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) por espectrofotometria na região do visível. No primeiro caso, foi utilizado o leitor de microplacas multimodal Infinite 200 Pro (Tecan), e no segundo caso, foi utilizado o espectrofotômetro UV-2700 (Shimadzu), ambos realizando leituras em comprimento de onda de 600 nm.

No caso dos cultivos em frascos estáticos, a relação entre densidade óptica e concentração celular (massa seca) foi realizada através de técnica gravimétrica. Ao fim do cultivo, a densidade óptica foi determinada por espectrometria e uma amostra de 10 mL foi filtrada por filtração a vácuo em membrana Millipore de 0,22 μ m de porosidade. A massa celular retida no filtro foi lavada três vezes com água deionizada a fim de promover a retirada de resquícios de componentes presentes no meio. A membrana foi seca em microondas por 15 minutos, tempo para retirada de toda a água presente, pesada em balança de alta precisão e a massa seca obtida teve seu valor relacionado à absorbância medida (conforme metodologia adaptada de Olsson e Nielson (1997)).

4.8.2. Determinação dos metabólitos extracelulares

Das alíquotas retiradas nos ensaios de cinética, 1 mL foi centrifugado 10000 rpm por 10 minutos em centrífuga de bancada para microtubos CT15RE (Himac), para sedimentação da biomassa. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de politetrafluoretileno (0,22 μ m) para ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Prominence (Shimadzu) utilizando detector de índice de refração (RID). Foi utilizada uma coluna de troca iônica HPX-87H (Bio-Rad) a 60°C com 5 mM H_2SO_4 como fase móvel e fluxo de 0,6 L/min, para determinação das concentrações de glicose, xilose, ácido lático, ácido acético, glicerol e etanol bem como dos inibidores furfural e HMF.

Tabela 6. Identificação aproximada do tempo de retenção dos principais compostos analisados no detector RID (detector de índice de refração) na coluna HPX 87-H

Composto	Tempo de retenção (min)
Glicose	10
Xilose	10
Ácido láctico	13
Etanol	22
Ácido acético	16
HMF	28
Furfural	42
Glicerol	14

4.8.3. Cálculo dos parâmetros fisiológicos

O cálculo dos parâmetros fisiológicos foi realizado com o auxílio do *software* Excel 2010 (Microsoft). Dos cultivos de *screening* foram obtidas as curvas de crescimento, relacionando DO_{600} com o tempo de cultivo. A partir de linearização pela aplicação do logaritmo neperiano da fase exponencial, foi possível então obter a máxima velocidade específica de crescimento (μ_{max}) de cada cultivo nas diferentes condições, que equivale ao coeficiente angular da reta obtida através de regressão linear (Liu, 2017).

Nos experimentos de cinética em frascos estáticos (item 4.4), além do cálculo do μ_{max} , foram também calculados os fatores de conversão a partir das concentrações de açúcares e metabólitos ao longo do tempo. Para o fator de conversão de substrato a biomassa (Y_{xs}) foram plotados gráficos relacionando o consumo da glicose versus a produção de biomassa e traçando uma reta entre os pontos inicial e final, foi possível obter um coeficiente angular, equivalente a Y_{xs} . Para o fator de conversão de substrato aos metabólitos (Y_{ls} para lactato, Y_{es} para etanol e Y_{as} para acetato) foram plotados gráficos relacionando o consumo da glicose *versus* a produção de cada um dos metabólitos e traçando uma reta entre os pontos inicial e final, foi possível obter um coeficiente angular, equivalente ao fator de conversão do substrato ao referente metabólito (Liu, 2017). Para avaliação da significância das diferenças entre os valores de fatores de conversão obtidos, foram realizados testes Tukey com nível de confiança de 95% no *software* Minitab 19.

4.8.4. Estimativa de viabilidade da levedura

A viabilidade foi determinada através de microscopia óptica, em objetiva de 40x com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As amostras foram coradas diferencialmente com azul de metileno. Células viáveis não são coradas enquanto que as não viáveis são coradas em azul, o que propicia a visualização e diferenciação das células mortas das células vivas. O corante azul de metileno penetra as células mortas, visto que sua parede celular se degrada quando a levedura morre. A viabilidade foi expressa em porcentagem, em função da proporção de células vivas pelo total de células (viáveis + não viáveis) (Thomas e Ingledew 1990).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES AÇÚCARES

As bactérias lácticas são capazes de utilizar diversos compostos como fonte de carbono e energia, dentre eles podem ser citados: arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, gluconato, lactose, maltose, manitol, manose, rafinose, ribose, sorbitol, sacarose e trealose. Os açúcares geralmente são transportados através de permeases e no citoplasma são fosforilados para entrada nas vias metabólicas da bactéria (Corsetti, Prette e Garcia-Gonzalez, 2018).

Na fermentação alcoólica industrial de primeira geração, o melaço é composto principalmente de 45 a 60% de sacarose e 5 a 20% de glicose + frutose. Esse melaço é misturado ao caldo de cana para a obtenção de uma concentração final de açúcares redutores totais de 18 a 22% (m/m) (Basso, et al. 2011). Já os açúcares presentes na fermentação de segunda geração foram descritos por Lee (1997), sendo o bagaço de cana-de-açúcar em massa seca como sendo composto de aproximadamente 38,1% glicose, 1,1% galactose, 23,3% xilose, 2,5% arabinose e 18,4% lignina, valores que podem ser alterados a depender do pré-tratamento utilizado e características da biomassa em específico. Nota-se então que o hidrolisado de lignocelulósico é composto basicamente por pentoses e hexoses. Dentre as pentoses, as principais encontradas são xilose e arabinose. Já no referente a hexoses, as mais encontradas são glicose, manose e galactose (Hamelinck et al., 2005).

No intuito de se avaliar o crescimento das cepas bacterianas em diferentes açúcares potencialmente presentes em substratos a base de cana-de-açúcar, cultivos em microplacas foram realizados. Para tanto, uma cepa de *L. plantarum* (CECT 221) e uma de *L. fermentum* (DSM 20391) obtidos de coleções de cultura (referidas como laboratoriais), e uma cepa de *L. plantarum* (ESALQ 4) e uma de *L. fermentum* (ESALQ 3) isoladas do processo industrial de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar foram avaliadas. A Figura 23 apresenta os resultados obtidos das velocidades específicas de crescimento máxima ($\mu_{\max}$) de cada bactéria láctica na

presença de diferentes açúcares comumente presentes na produção de etanol (1G e 2G), a saber: sacarose, glicose+frutose, glicose, frutose, xilose e arabinose.

Figura 23. Gráficos comparativos da máxima velocidade específica de cada uma das 4 bactérias lácticas (*L. plantarum* CECT 221, *L. fermentum* DSM 20391, *L. plantarum* ESALQ 4 e *L. fermentum* ESALQ 3) nos diferentes açúcares A) Sacarose, B) Glicose + Frutose, C) Glicose, D) Frutose, E) Xilose, F) Arabinose. Teste Tukey com 95% de confiança onde as médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes para cada gráfico. Fonte: autora

5.1.1. Crescimento em hexoses

As hexoses são metabolizadas pelas bactérias láticas através da via EMP, quando homofermentativas, geram apenas ácido láctico e quando heterofermentativas geram quantidades equimolares de ácido láctico e etanol/ácido acético (Kandler, 1983).

SACAROSE - A sacarose é um dissacarídeo que é formado por glicose e frutose. Sua presença é majoritária no caldo de cana utilizado para a fermentação de etanol 1G. Existem 3 vias pelas quais a sacarose pode ser metabolizada nas bactérias láticas (Figura 24): I) pode ocorrer a hidrólise extracelular e posterior transporte para o interior da célula; II) transporte em concomitância a fosforilação da sacarose pelo sistema fosfotransferase para posterior hidrólise; ou III) transporte seguido da fosforilação pela sacarose fosforilase ou hidrólise. Esta última apresenta-se como alternativa mais energeticamente vantajosa pois dessa forma a glicose é fosforilada com fosfato inorgânico e não necessita o uso de ATP para fazê-lo (Ganzle e Follador, 2012)

Segundo Ganzle e Follador (2012), cepas *L. plantarum* e *L. fermentum* apresentam os mesmos genes codificados para a assimilação de sacarose (sacA, PtsBCA e sack1). O gene sacA é responsável por hidrolisar a sacarose em glicose e frutose, PtsBCA codifica o transportador para sacarose sem fosforilação prévia e sack1 codifica a enzima responsável por fosforilar a frutose (Ganzle e Follador, 2012). O que difere na assimilação de sacarose para os dois tipos de metabolismo pode estar ligado à expressão dos genes de transporte, que são induzidos pelo substrato nas LAB heterofermentativas, o contrário é observado nas LAB homofermentativas. Além disso, o transporte da sacarose é mais eficiente quando feito acoplado com fosforilases ao custo de acceptor de elétrons, o que pode gerar competição pelo uso da frutose como acceptor de elétrons, para a via de produção de manitol ou para o transporte de sacarose (Ganzle, 2015)

Foi possível observar que na presença da sacarose houve crescimento em todas as bactérias láticas, exceto na heterofermentativa de coleção (*L. fermentum* DSM 20391). O motivo pelo qual a cepa DSM 20391 não apresentou crescimento em sacarose pode ser devido a ela ter sido isolada de um ambiente onde a sacarose não representa uma fonte de carbono viável e, portanto, os genes ligados a assimilação de sacarose são ausentes ou encontram-se não expressos e o tempo

de cultivo não foi suficiente para a adaptação a nova condição, reforçando a dependência das bactérias heterofermentativas à indução pelo substrato para a expressão dos genes de transporte de sacarose (Ganzle e Follador, 2015)

Os valores de $\mu_{\max}$ obtidos ficaram entre $0,34\text{h}^{-1}$ e $0,43\text{h}^{-1}$. Para saber ao certo qual das vias de assimilação de sacarose apresenta preferência, estudos adicionais devem ser realizados.

Figura 24. Representação esquemática das vias pelas quais a sacarose pode ser metabolizada em bactérias lácticas

Fonte: adaptado de Ganzle e Follador, 2012

GLICOSE + FRUTOSE – Na presença de glicose e frutose as bactérias homofermentativas de coleção e de usina apresentaram $\mu_{\max}$ de $0,41\text{h}^{-1} \pm 0,01$ e $0,45\text{h}^{-1} \pm 0,01$. Nas bactérias lácticas heterofermentativas foi possível observar valores de $\mu_{\max}$ de $0,63\text{h}^{-1} \pm 0,02$ para a heterofermentativa de coleção e $0,62\text{h}^{-1} \pm 0,01$ para a de usina, pois além do uso da glicose como fonte de carbono, a frutose auxilia o crescimento servindo de aceptor final de elétrons (onde é convertida a manitol) em condições em que o oxigênio está em baixa quantidade ou ausente. A conversão a ácido láctico gera 3 mol de NADH e somente 2 são reoxidados, necessitando assim de um aceptor final de elétrons para realizar a reoxidação do NADH restante. Outros aceptores que podem ser utilizados são malato, piruvato, ácido acético e glicerol (Kandler, 1983).

GLICOSE – Com a glicose como fonte de carbono, as bactérias lácticas estudadas não apresentaram diferença significativa nos valores de $\mu_{\max}$, exceto para a heterofermentativa de usina, que apresentou $\mu_{\max}$ de $0,27\text{h}^{-1}$. A glicose é metabolizada pelas bactérias lácticas através da via EMP onde os açúcares são

convertidos a piruvato e posteriormente metabolizados a ácido láctico e ácido acético e etanol, no caso das heterofermentativas (Kandler, 1983).

FRUTOSE - Na presença de frutose foi possível observar o melhor desempenho das LAB heterofermentativas, visto que, conforme mencionado anteriormente, as LAB heterofermentativas fazem o uso da frutose como aceptor externo de elétrons. Além disso, a frutose pode ser convertida a glicose pela glicose-6-fosfato isomerase, possibilitando o uso do açúcar para a produção de ácido láctico e ácido acético e etanol, no caso das heterofermentativas (Kandler, 1983). Para as homofermentativas, os valores de $\mu_{\max}$ foram de $0,38 \text{ h}^{-1}$ e $0,47 \text{ h}^{-1} \pm 0,01$ para LAB de coleção e de usina, respectivamente. Nas heterofermentativas, os valores obtidos não se mostraram significativamente diferentes, sendo $0,51 \text{ h}^{-1}$ para de coleção, e $0,54 \text{ h}^{-1}$ para isolada de usina.

5.1.2. Crescimento em pentoses

Diversas espécies de lactobacilos já foram reportadas com a capacidade de metabolizar xilose ou arabinose a ácido láctico. Estudos demonstraram *L. pentosus* (Bustos et al., 2005), *L. brevis* (Chaillou et al., 1998), e *L. plantarum* (Helanto et al., 2007) como cepas capazes de fermentar pentoses, resultando quantidades equimolares de ácido acético/etanol e ácido láctico (Fred et al., 1919).

ARABINOSE – O crescimento das cepas de coleção na presença de arabinose foi bem limitado em comparação às cepas industriais. Das cepas de coleção, apenas a homofermentativa apresentou algum crescimento com $\mu_{\max} 0,1 \text{ h}^{-1}$. As cepas industriais, por sua vez, apresentaram uma $\mu_{\max}$ de $0,36 \text{ h}^{-1} \pm 0,01$ para o cultivo com a LAB homofermentativa, e de $0,32 \text{ h}^{-1} \pm 0,01$ para a heterofermentativa. Nestes microrganismos, a arabinose é convertida a xilulose-5-fosfato pela arabinose isomerase, ribuloquinase e ribulose 5-fosfato 4-epimerase conforme Figura 25. Posteriormente, xilulose 5-fosfato é convertida a quantidades equimolares de ácido acético e ácido láctico através da via fosfocetolase (PK). Okano et al. (2009), demonstraram a fermentação homolática de uma espécie de *L. plantarum* modificada geneticamente utilizando como fonte de carbono arabinose e xilose através da via pentose fosfato (PP).

Figura 25. Representação esquemática simplificada da via metabólica tendo arabinose como fonte de carbono para as bactérias lácticas

Fonte: adaptado de Okano, 2009

XILOSE - Nenhuma das cepas homofermentativas (de coleção e de usina) teve capacidade de utilizar a xilose como fonte de carbono, e não foi observado crescimento em tais condições, isso se deve pela falta da enzima fosfoetolase. Por outro lado, nos cultivos com as cepas heterofermentativas houve crescimento na presença deste substrato. A velocidade específica máxima de crescimento em ambas as cepas heterofermentativas foi significativamente inferior ($0,17 \text{ h}^{-1}$ para a cepa de laboratório e $0,19 \text{ h}^{-1} \pm 0,01$ para a cepa industrial) em relação aos cultivos em outras fontes de carbono, como em glicose ou frutose. Já ao se comparar com outra pentose, a arabinose, ambas homofermentativas obtiveram crescimento, agindo como heterofermentativas facultativas com a presença de aldolase para metabolizar a arabinose. No caso da xilose, o crescimento em homofermentativas pode não ter ocorrido devido a falta de transportadores para interiorizar a xilose e assim proporcionar seu uso através da enzima aldolase. Como continuidade, uma avaliação mais aprofundada da cinética de consumo de açúcares e produção de metabólitos foi realizada para as LAB em xilose visando a obtenção de parâmetros fisiológicos adicionais.

5.2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS EM FRASCOS ESTÁTICOS NA PRESENÇA DE XILOSE

A xilose é um dos açúcares mais presentes nas hemiceluloses e, portanto, foram conduzidos ensaios em frascos estáticos com as bactérias lácticas do estudo

na presença de xilose como principal fonte de carbono para a obtenção de parâmetros fisiológicos adicionais.

Através dos ensaios de cinética foi possível confirmar que a bactéria lática homofermentativa praticamente não apresentou crescimento na presença de xilose como fonte de carbono, como mostra a Figura 26. Já na LAB heterofermentativa observou-se um crescimento lento, com velocidade específica máxima de crescimento de $0,18h^{-1}$, corroborando os ensaios em microplacas. Os resultados obtidos nessas condições estão em conformidade com o trabalho de Collograi (2019), onde também foi verificado o crescimento de bactérias láticas em meio rico em nutrientes na presença de xilose, podendo representar um problema para o processo de produção do etanol 2G, devido ao desvio desses açúcares da produção de etanol para ácidos orgânicos. Nesse quesito, a bactéria homofermentativa, que não apresentou crescimento em xilose, parece não representar competição em relação a esse açúcar, no entanto pode vir a competir com a levedura pelos outros açúcares como glicose e frutose, agravando a situação de contaminação nas dornas.

Figura 26. Curvas de crescimento na cinética de bactérias industriais homofermentativas (*L. plantarum* E4) e heterofermentativas (*L. fermentum* E3) de ácido láctico na presença de xilose

FONTE: autora

O metabolismo da xilose pode ocorrer por duas vias: Fosfocetolase (PK) e Via das Pentoses Fosfato (PPP) + Via Glicolítica (Figura 27). A via PK é a mais utilizada, onde xilulose-5P é clivada a gliceraldeído e acetil-P. O gliceraldeído resultante é convertido a ácido pirúvico e depois a ácido láctico. O Acetil-P é metabolizado a etanol ou ácido acético (Patel et al., 2006). Vários fatores podem

influenciar na capacidade natural de metabolizar xilose, como concentração inicial celular e de açúcares, pH, temperatura, inibidores e adição de suplementos (Nakanishi et al., 2017). Tanaka et al. (2002) demonstraram que em *L. lactis* IO-1 houve um aumento da expressão de enzimas como transaldolase e transcetolase com o aumento da concentração inicial de xilose, o que levou a bactéria a realizar a metabolização do açúcar pela Via das Pentoses Fosfato, resultando em um maior fator de conversão para ácido láctico e menor conversão a ácido acético. Okano et al. (2009) através de engenharia genética, modificaram uma cepa *L. plantarum*, tornando-a capaz de metabolizar pentoses através da via pentose fosfato de forma homolática, aumentando assim o rendimento (0,89 g lactato/g de xilose) para produção de ácido láctico.

Figura 27. Esquema simplificado do metabolismo da xilose em bactérias lácticas

Fonte: adaptado de Tanaka 2002

No presente trabalho, pouco mais da metade da xilose foi consumida pela bactéria heterofermentativa em 24h de cultivo, sendo que ao final do cultivo observou-se uma concentração de xilose residual de 9,2g/L (Figura 28A). O fator de conversão de xilose a lactato ($Y_{LAC/XYL}$) foi de 0,37g de lactato por g de xilose consumida e para acetato ($Y_{ace/XYL}$) foi de 0,153 g/g. O etanol detectado provavelmente teve origem do inóculo, visto que seu crescimento se deu em MRS contendo glicose como fonte de carbono. Existem poucos trabalhos reportando a fermentação de pentoses em LAB, um deles foi realizado por Tanaka et al. (2002) que obteve fator de conversão para lactato de 0,68g/g em *L. lactis* IO-1. Por outro

lado, a LAB homofermentativa não foi capaz de utilizar a xilose presente no meio de cultivo (Figura 28B), provavelmente devido à ausência da enzima fosfocetolase.

Figura 28. Cinética de consumo de açúcar e produção de metabólitos da bactéria láctica A) heterofermentativa (*L. fermentum*) e B) homofermentativa (*L. plantarum*) na presença de xilose como principal fonte de carbono

Fonte: autora

Diversas cepas de lactobacilos já foram descritas como fermentadoras de xilose: *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. curvatus* (Litchfield, 2009, Lopes, 2008; Vijayakumar et al., 2008). Em trabalho realizado por Wischral et al. em 2019, onde algumas espécies de *Lactobacillus* foram avaliadas em MRS na presença de 20 g/L de xilose (*L. coryniformis torquens* ATCC 25600, *L. coryniformis coryniformis* ATCC 25602, *L. helveticus* ATCC 15009, *L. pentosus* ATCC 8041 e *L. delbrueckii lactis* DSM 20076), os valores de ácido láctico produzido variaram de 1,97 g/L a 16,19 g/L, chegando a fatores de conversão próximos de 1g de ácido láctico por grama de xilose.

Gubelt et al. (2020) testaram também a capacidade de lactobacilos em fermentar a xilose. Na presença de xilose, apenas as cepas heterofermentativas foram capazes de fermentar o açúcar, enquanto *L. plantarum* e *L. lactis*, de metabolismo homofermentativo, não foram capazes de metabolizar essa pentose mesmo com a presença de glicose no cultivo. Também foi comprovada a habilidade de *L. brevis* em co-metabolizar glicose e xilose no mesmo cultivo, tornando essa cepa interessante para futuros estudos e utilização em fermentações envolvendo biomassa lignocelulósica.

5.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS

Para a avaliação inicial, foi realizado um experimento onde diversas bactérias lácticas, listadas na Tabela 4, foram expostas à presença de 6 inibidores lignocelulósicos em duas concentrações (Tabela 5), no intuito de avaliar o efeito de diferentes inibidores da classe dos furanos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos sobre tais microrganismos, que constituem potenciais contaminantes de processos industriais de produção de biocombustíveis (van der Pol et al., 2015). Através dos cultivos em microplacas, foi possível a obtenção de valores de DO_{600} em função do tempo, e conseqüentemente a construção do gráfico da cinética de crescimento para cada cepa na presença e na ausência dos inibidores. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi calculada, sendo o coeficiente angular da reta obtida pela linearização da fase exponencial do crescimento. O valor de μ_{max} foi calculado para cada uma das condições e seus valores médios foram ordenados em um heat-map relativo (Figura 29)

O valor de μ_{max} de cada cepa bacteriana na presença dos inibidores foi comparada ao cultivo controle, ou seja, na ausência dos inibidores. Dessa forma, os valores apresentados na figura abaixo se referem ao valor relativo do μ_{max} na presença do inibidor em relação à condição controle ($(\mu_{max \text{ inibidor}}/\mu_{max \text{ controle}})-1$). Quanto mais negativo o valor, ou seja, mais tendendo ao vermelho, maior o efeito inibitório dos componentes avaliados sobre esse parâmetro. Por outro lado, quanto maior e positivo o valor, ou seja, tendendo à cor verde, o composto teve um efeito estimulante à μ_{max} . O efeito de cada classe de composto foi apresentado nos itens abaixo:

Figura 29. Heat map dos valores de velocidade específica máxima obtidos nos tratamentos com os inibidores em relação ao tratamento controle (sem inibidores) que representa o zero. Valores com tendência ao verde significam ensaios onde a velocidade específica máxima foi beneficiada com a presença dos inibidores. Valores com tendência ao vermelho, indicam ensaios onde a presença dos inibidores foi prejudicial ao cultivo.

Bactérias lácticas homofermentativas: A (coleção), B, C, D e E (de usina). Bactérias lácticas heterofermentativas: F (coleção), G, H, I, J, K e L (de usina). Fonte: autora

5.3.1. Compostos furânicos

Foi estudado o efeito do HMF e do furfural em bactérias ácido lácticas de metabolismo homo- e heterofermentativo. De forma inesperada, observou-se que nas bactérias heterofermentativas esses compostos tiveram um efeito positivo na cinética de crescimento, aumentando o valor de $\mu_{\max}$ em até 1,4 vezes quando comparada ao tratamento controle. Por outro lado, as bactérias homofermentativas

tiveram seu crescimento inibido por estes mesmos compostos, onde foi observada uma redução no valor de $\mu_{\max}$, conforme ilustrado na Figura 29. Outra observação feita foi que as bactérias lácticas heterofermentativas de laboratório foram menos estimuladas que as industriais.

Mesmo quando adicionados em altas concentrações a uma cultura bacteriana, os compostos furânicos pareceram melhorar o desempenho do crescimento. Segundo Van Niel et al. (2012), furfural e HMF podem atuar como aceptores de elétrons alternativos nas bactérias lácticas. Em seu trabalho, Van Niel et al. (2012) observou o crescimento de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 em glicose, utilizando furfural (1g/L) e HMF (0,5g/L) como aceptores de elétrons, evidenciado através de testes enzimáticos específicos para essa atividade, obtendo um aumento de 25% no valor de $\mu_{\max}$ e 15% no fator de conversão de substrato em biomassa. Esse mecanismo também ocorre na levedura *S. cerevisiae*, e foi revisado por Liu em 2011, indicando que algumas cepas de leveduras são capazes de detoxificar o meio, reduzindo furfural e HMF de suas formas aldeído para seus álcoois respectivos, convertendo cerca de 100% de HMF (60mM) e de furfural (30mM) (Liu; Slininger; Gorsich, 2005) (Figura 30).

Figura 30. Mecanismo de detoxificação dos compostos furânicos

Fonte:(LIU, 2011)

Sendo assim, surge-se a hipótese de que as bactérias lácticas heterofermentativas também têm a capacidade de reduzir os compostos furânicos utilizando NADH e NADPH como cofatores (Figura 30), e isso contribui de alguma forma para o aumento nos valores de $\mu_{\max}$ em relação ao cultivo sem tais compostos. Por outro lado, nas homofermentativas, a presença desses compostos teve um

efeito inibidor nos valores de $\mu_{\max}$ indicando que as mesmas certamente não foram capazes de detoxificar o meio com esses inibidores.

Van der pol et al. (2016) testaram 5 cepas de bactérias láticas e analogamente, as testou em concentrações de furfural e HMF de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5 e 5g/L em microplacas de 48 poços avaliando o crescimento relativo (%) a um controle, sendo este parâmetro calculado pela diferença entre a OD₆₀₀ final e inicial em relação ao cultivo controle (sem inibidor), verificando inibição progressiva para *Lactobacillus casei* DSM20011 e *Bacillus smithii* DSM4216 com o aumento da concentração, enquanto que *Lactobacillus delbrueckii* DSM20073, *Lactococcus lactis* DSM20481, *Bacillus coagulans* DSM2314 foram estimuladas para concentrações até 1g/L de HMF e 0,5g/L de furfural.

Gubelt et al (2020) testaram cepas de lactobacilos em diversas concentrações de furfural e HMF. *L. plantarum* foi a LAB com a maior concentração de compostos furânicos necessária para a inibição de 10% de seu crescimento (IC₁₀), no valor de 6,9 g/L para furfural e 8g/L para HMF.

5.3.2. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos utilizados neste trabalho foram: ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico. Para a maioria dos ácidos foram observados efeitos negativos sobre os cultivos bacterianos, sendo o ácido fórmico a 2 g/L o mais prejudicial, provavelmente por ser o menor dentre os ácidos estudados, e ter sua difusão intensificada através da membrana citoplasmática (Almeida et al., 2007). O ácido levulínico foi o menos prejudicial na concentração 3g/L. O efeito dos ácidos orgânicos sobre o crescimento de bactérias láticas foi avaliado por van der Pol, 2016, observando também ser o ácido levulínico o menos prejudicial nas concentrações por eles avaliadas (0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10g/L), sendo *B. smithii* DSM4216 a mais sensível dentre as bactérias láticas testadas, chegando a uma taxa de crescimento relativa de 52% com a presença de 10g/L de ácido levulínico. O ácido fórmico analogamente ao obtido nesse trabalho foi o mais agressivo dentre os ácidos, levando *B. smithii* a uma taxa relativa de crescimento de 5% na presença de 7,5g/L.

Em condições de pH ácidos, a maior parte da concentração dos ácidos orgânicos em meio extracelular encontra-se na forma não-dissociada e adentram a célula por difusão facilitada, onde dissociam-se no interior da célula bacteriana, causando uma redução no pH interno, o que prejudica o metabolismo da bactéria (Axe; Bailey, 1995). Além disso, a bactéria visando manter a homeostase, com a queda do pH, tem a necessidade de expulsar os prótons para normalizar a concentração de H⁺ intracelular, essa expulsão ocorre com gasto de ATP, e ao utilizar energia para esse ciclo, ela acaba por prejudicar o próprio crescimento (Verduyn, 1992).

Gubelt et al 2020, avaliaram a influência que o pH exerce na concentração de inibidores que promove a queda no crescimento de *L. brevis* IGB 1.29. Para compostos fenólicos e derivados furânicos, com a alteração do pH de 4 para 6, as LAB não demonstram diferença significativa na inibição de seu metabolismo. No entanto, tratando-se dos ácidos orgânicos foi observado que a alteração de pH influencia fortemente no potencial de inibição desses compostos.

5.3.3. Compostos fenólicos

Um dos compostos fenólicos de maior abundância nos hidrolisados lignocelulósicos de bagaço de cana é o ácido cumárico (van der Pol et al., 2015). Através do *screening* pode-se observar que o ácido cumárico possui um efeito negativo sobre a $\mu_{\max}$ em praticamente todas as bactérias investigadas. Esses compostos estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que prejudica a síntese de RNA e proteínas, além de causar danos à membrana citoplasmática, que perde sua capacidade de atuar como barreira seletiva (Palmqvist; Hann-Hägerdal, 2000a).

Van der Pol, 2016 observou que além do ácido cumárico, o ácido ferúlico também apresenta efeito inibitório significativo na categoria dos compostos fenólicos, sendo que a concentração de 2,5g/L de ácido cumárico inibiu fortemente todas as bactérias lácticas estudadas por ele. Em concentrações mais baixas (0,25g/L, aproximadas com as testadas nesse trabalho), o efeito do ácido cumárico foi avaliado como sendo positivo, chegando a um crescimento relativo de 114% para *L. lactis*. No entanto, em concentração mais elevada desse composto fenólico (0,75g/L), a mesma bactéria láctica apresentou inibição, chegando a um crescimento

relativo de 52%. Gubelt et al 2020 também avaliaram o efeito da presença de compostos fenólicos em bactérias láticas. *L. brevis* ATCC 367 apresentou 10% de inibição de seu crescimento na presença de 1,44 g/L de fenol.

5.4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS NA PRESENÇA DOS INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS

Devido aos resultados divergentes entre bactérias do tipo homo- e heterofermentativa na presença de compostos furânicos (HMF e furfural), decidiu-se realizar uma cinética de crescimento que permitisse amostragens para quantificação de substratos e produtos ao longo do tempo. Para tanto, foram realizados cultivos em frascos estáticos com as bactérias láticas industriais mais robustas e representativas, selecionadas pelo experimento de *screening* (item 5.1). Assim, avaliou-se uma bactéria lática de metabolismo homofermentativo (*L. plantarum* ESALQ 4) e uma de metabolismo heterofermentativo (*L. fermentum* ESALQ 3).

Através da medida do crescimento e do consumo de açúcares e da formação de produtos foi possível a caracterização dos efeitos dos compostos inibidores sobre parâmetros adicionais, tais como a cinética de consumo de substrato e produção de produto, além do cálculo de fatores de conversão.

5.4.1. Velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$)

Na bactéria lática homofermentativa foi possível observar que os compostos furânicos tiveram efeitos negativos sobre o metabolismo celular, conforme observado pela diminuição de $\mu_{\max}$ de $0,3582 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ no controle (meio sem HMF ou furfural) para $0,2976 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ na presença de furfural (2,5 g/L) e $0,2074 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ na presença de HMF (4,0 g/L). Por outro lado, condizente com os experimentos em microplacas, na bactéria heterofermentativa, observou-se o contrário, a $\mu_{\max}$ na presença de compostos furânicos foi afetada positivamente, apresentando um valor de $0,4144 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ em furfural (2,5 g/L) e $0,3092 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ em HMF (4,0 g/L), enquanto na condição controle o valor de $\mu_{\max}$ foi de $0,2958 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$, como ilustrado na Figura 31.

Figura 31. Efeito de compostos inibitórios na máxima velocidade específica de crescimento de bactérias industriais A) homofermentativa *L. plantarum* ESALQ 4 e B) heterofermentativas *L.*

fermentum ESALQ 3 de ácido láctico. Teste Tukey com 95% de confiança onde as médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Fonte: autora

Conforme citado no item 5.1.1, é possível que os compostos furânicos atuem como aceptores de elétrons, permitindo a reoxidação as coenzimas e reduzindo para uma forma menos tóxica e assim proporcionando o crescimento das bactérias heterofermentativas. Esse comportamento já foi observado para outros microrganismos: Van Niel et al., 2012 avaliou o crescimento de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 em glicose, utilizando furfural (1g/L) e HMF (0,5g/L), e evidenciou o uso dos mesmos como aceptores de elétrons. Gutierrez et al., 2002 observou a redução do furfural ao seu respectivo álcool em cepa etanologênica de *Escherichia coli* que na presença de concentrações acima de 10mM (0,96g/L) foi possível observar que o composto não afetou o fator de conversão final de etanol. Van der pol et al. (2016) nas 5 cepas de bactérias lácticas testadas obteve inibição progressiva nas bactérias homofermentativas, que não são capazes de detoxificar o meio, enquanto que as heterofermentativas foram estimuladas para concentrações até 1g/L de HMF e 0,5g/L de furfural avaliando-se o crescimento relativo em comparação a cultivos sem inibidores.

Além da alteração nos valores de $\mu_{\max}$ na presença desses compostos (Figura 31), foi possível notar alterações referentes à duração da fase lag (Figura 32). Nas bactérias lácticas homofermentativas foi possível observar o alongamento dessa fase na presença de inibidores. Sabe-se que os compostos furânicos podem tornar a fase lag mais longa e consequentemente diminuir o crescimento e produtividade dos

produtos de interesse (Palmqvist and Hahn-Hagerdal 2000a). Por outro lado, nas bactérias heterofermentativas, observou-se uma redução da duração da fase lag, em relação ao cultivo controle.

Liu et al. (2011) descreveu que a superexpressão de enzimas como álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase em leveduras, pode estar relacionada à diminuição da fase lag e ao aumento da resistência aos compostos furânicos, sendo que o mesmo fenômeno poderia justificar o que foi observado nas bactérias lácticas heterofermentativas. No experimento controle, as bactérias lácticas heterofermentativas iniciaram a fase exponencial com aproximadamente 5 h de cultivo. Já na presença do furfural é possível notar que em cerca de 2 h, elas já se encontram em fase exponencial. O efeito sobre a fase lag é menos pronunciado com HMF, no entanto é possível notar uma maior inclinação, indicando maior velocidade de crescimento.

Figura 32. Efeito de compostos inibitórios na cinética de crescimento de bactérias industriais A) homofermentativa *L. plantarum* ESALQ 4 e B) heterofermentativas *L. fermentum* ESALQ 3 de ácido láctico.

Fonte: autora

5.4.2. Cinética do consumo de substrato e formação de produtos

Uma vez que os cofatores NADPH e NADH estão sendo utilizados para a detoxificação do meio, essa reação de redução adiciona estresse adicional às células, afetando o crescimento, uma vez que esses cofatores estão envolvidos em inúmeras vias de biossíntese. Como resultado, muitos processos metabólicos podem ser significativamente na presença desses inibidores (Vèrtes et al., 2011).

No cultivo com a bactéria láctica homofermentativa, a cinética de consumo de açúcar aparentou ser mais lenta na presença de inibidores em relação ao controle (Figura 33A), e também foi possível notar a desaceleração na cinética de produção de lactato (Figura 33B). Isso pode ter ocorrido porque *L. plantarum* não foi capaz de desintoxicar o meio, e o furfural e o HMF permanecem no meio exercendo um efeito deletério. O furfural além de exercer danos à membrana das células, também é capaz de inibir diversas enzimas da via glicolítica como hexoquinase, responsável pela quebra da glicose e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) (Almeida et al., 2007). Dessa forma, na presença dos inibidores, a inibição de enzimas da via glicolítica, ocasiona uma queda na produção de piruvato o que consequentemente afeta a produção de ácido láctico, visto que o piruvato é seu precursor.

Figura 33. Cinética do A) consumo de glicose e produção de B) lactato na bactéria homofermentativa (*L. plantarum* ESALQ 4)

Fonte: autora

As bactérias lácticas heterofermentativas geralmente possuem um crescimento lento em glicose, causado pela baixa velocidade de reoxidação dos dois NADH extras na via do etanol (Maicas; Ferrer; Pardo, 2002). Tanto na presença de furfural com de HMF, houve um aumento na cinética de consumo de glicose em relação à condição controle (Figura 34A). Além disso notou-se um desvio em direção à

formação de acetato (Figura 34C) e a diminuição da produção de lactato (Figura 34B). Especula-se que esse desvio ocorreu pois o furfural e o HMF, agindo como recicladores de NADH e NADPH, respectivamente, tornam a via de produção de acetato mais vantajosa energeticamente (Ganzle, 2015)

Figura 34. Cinética de A) consumo de glicose e produção de B) lactato, C) acetato e D) etanol na bactéria heterofermentativa (*L. fermentum* ESALQ 3)

Fonte: autora

Ao exemplo do que ocorre em *S. cerevisiae*, a transformação dos aldeídos furânicos a seus respectivos álcoois é catalisada pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase (ARI1, ADH6, ADH7ALD4 e ALD7), as quais utilizam NADPH e NADH como cofatores, respectivamente, aumentando assim a tolerância a compostos furânicos. Análogo ao que ocorre em *S. cerevisiae*, as bactérias heterofermentativas na presença de compostos furânicos podem ter os

cofatores NADH e NADPH reoxidados pela redução de furfural e HMF. Isto poderia levar a uma aceleração da glicólise, pois através da redução dos compostos furânicos aos alcoóis correspondentes, foram disponibilizados os cofatores reoxidados, necessários para a ocorrência das reações de glicólise (Liu et al., 2011).

Além disso, ao serem reduzidos aos alcoóis correspondentes esses componentes oferecem menos danos aos microrganismos, visto que são menos tóxicos que os aldeídos dos quais foram originados (van Niel et al., 2012).

Tabela 7. Fatores de conversão de substrato em biomassa e do substrato em metabólitos (Y_{ls} para lactato, Y_{es} para etanol e Y_{as} para acetato) para as bactérias heterofermentativa *L. fermentum* ESALQ 3 e homofermentativa *L. plantarum* ESALQ 4 na presença de HMF (4g/L) e furfural (2,5g/L)

Cepa	Condição	Y_{xs}	Y_{ls}	Y_{es}	Y_{as}	Balanco de Carbono (%)
Heterofermentativa	Controle	0,093±0,007	0,854±0,013	0,113±0,004	0,032±0,0007	114±0,016
	HMF	0,087±0,007	0,592±0,016	0,175±0,015	0,101±0,008	103±0,05
	Furfural	0,076±0,004	0,579±0,007	0,221±0,004	0,068±0,0004	103±0,009
Homofermentativa	Controle	0,100±0,004	1,148±0,039	n.d.	n.d.	127±0,035
	HMF	0,089±0,005	1,156±0,038	n.d.	n.d.	126±0,036
	Furfural	0,093±0,002	1,132±0,009	n.d.	n.d.	124±0,011

Os números representam a média entre 3 experimentos independentes com +- o desvio padrão de cada condição. Fonte: autora

Ao observar os fatores de conversão, foi possível notar que nos cultivos na presença de HMF e furfural, ocorreu uma diminuição do fator de conversão de células a substrato (Y_{xs}) em relação ao cultivo controle para as duas bactérias (Tabela 7). No caso do furfural, o valor foi de 93% e 82% e para HMF 89% e 93% nas cepas homo e heterofermentativas, respectivamente comparados com o controle. Como as bactérias lácticas homofermentativas não são capazes de detoxificar o meio, elas sofreram os efeitos deletérios dos compostos furânicos, diminuindo a produção de biomassa, sendo mais significativo na presença de HMF (Figura 35 - I). Nas heterofermentativas, pela constante reoxidação de NADPH, não foi possível notar uma diferença significativa de Y_{xs} na presença de HMF, no entanto na presença de furfural houve decréscimo significativo (Figura 36 - I)

Nas bactérias homofermentativas não houve alteração significativa em Y_{sl} (Figura 35 - II), já nas heterofermentativas fica evidenciada a diminuição desse fator de conversão a lactato pois houve desvio da fonte de carbono para a produção de etanol, que dobrou na presença do furfural (Figura 36 – III) e do acetato que em HMF teve valor de Y_{sa} triplicado (Figura 36 - IV).

Cabe destacar que o balanço de carbono está ligeiramente superestimado, pois houve sobreposição dos picos de ácido láctico e os produtos de detoxificação dos compostos furânicos nas análises de HPLC. Essa superestimação será posteriormente resolvida em etapas futuras do trabalho, com a aplicação de testes enzimáticos para a quantificação das concentrações de ácido láctico, além da posterior avaliação e quantificação dos produtos da detoxificação.

Figura 35. Teste Tukey realizado com 95% de confiança para os fatores de conversão I) Y_{xs} (de substrato a biomassa), II) Y_{sl} (de substrato a lactato) na bactéria homofermentativa. Para cada gráfico, as letras iguais em cada barra indicam tratamentos onde não houve diferença significativa e as letras diferentes indicam tratamentos onde houve diferença significativa.

Fonte:autora

Figura 36. Teste Tukey realizado com 95% de confiança para os fatores de conversão I) Y_{xs} (de substrato a biomassa), II) Y_{ls} (de substrato a lactato), III) Y_{es} (de substrato a etanol) e IV) Y_{as} (de substrato a acetato) na bactéria heterofermentativa. Para cada gráfico, as letras iguais em cada barra indicam tratamentos onde não houve diferença significativa e as letras diferentes indicam tratamentos onde houve diferença significativa.

Fonte: autora

No presente trabalho, também se pode observar que o fator de conversão de glicose a lactato diminuiu também em todos os experimentos, sendo que os desvios nas bactérias lácticas heterofermentativos diminuíram 70% em relação ao controle. O que pode explicar essa queda é a inibição de enzimas do metabolismo do ácido láctico. Bai et al. (2015) reportou a inibição de quatro enzimas chaves no metabolismo do ácido láctico em *Sporolactobacillus inulinus*, com a diminuição de quase 80% da atividade de lactato desidrogenase na presença de 5g/L de furfural. Além disso, nas bactérias lácticas heterofermentativas, a via de produção do lactato acaba sendo desviada para a produção de acetato, visto que na presença de derivados furânicos torna-se uma rota energeticamente mais vantajosa (Ganzle, 2015).

5.4.3. Cinética de metabolização de compostos furânicos

No cultivo com a bactéria láctica homofermentativa, foi possível observar que *L. plantarum* não foi capaz de detoxificar o meio, pois observou-se apenas ligeiras alterações nas concentrações de furfural e HMF (Figura 37). Desta forma, os dois compostos exerceram um efeito deletério sobre o crescimento da bactéria, evidenciado pela diminuição de $\mu_{\max}$. O contrário pôde ser observado nos cultivos com a bactéria heterofermentativa, onde a concentração dos compostos inibidores furfural e HMF apresentaram uma queda substancial nas primeiras horas do cultivo (Figura 37). Tudo indica que as bactérias heterofermentativas transformaram esses compostos em seus respectivos álcoois (a ser evidenciado em estudos futuros), levando a uma detoxificação parcial do meio de cultivo.

Figura 37. Variação da concentração de A) furfural e B) HMF nas bactérias homofermentativa *L. plantarum* ESALQ 4 e heterofermentativa *L. fermentum* ESALQ 3 no decorrer do tempo de cinética.

Fonte: autora

5.5. CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM CO-CULTIVO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS E LEVEDURA NA PRESENÇA DE HMF E FURFURAL

Para investigar os efeitos dos inibidores na presença dos principais microrganismos presentes na fermentação alcoólica num eventual processo a base de material lignocelulósico (no contexto de etanol 2G), foi realizado co-cultivo das bactérias lácticas de metabolismo homo- e heterofermentativo com uma levedura

industrial na presença de dois inibidores lignocelulósicos (HMF e furfural). A escolha destes dois inibidores deve-se ao fato de que eles apresentaram toxicidade diferenciada entre as LAB de tipo metabólico homo- e heterofermentativo (item 5.4). Nesse intuito, foram realizados os seguintes experimentos: Co-cultivo entre *L. fermentum* ESALQ 3 e *S. cerevisiae* PE-2; co-cultivo entre *L. plantarum* ESALQ 4 e *S. cerevisiae* PE-2; co-cultivo entre *L. fermentum* ESALQ 3, *L. plantarum* ESALQ 4 e *S. cerevisiae* PE-2; e um cultivo controle apenas com *S. cerevisiae* PE-2. Todos os experimentos foram realizados em meio contendo os dois inibidores, com glicose como fonte de carbono.

5.5.1. Viabilidade da levedura

Após 24h de co-cultivo da levedura junto às bactérias lácticas foi possível observar que no tratamento apenas com a LAB homofermentativa, a viabilidade das leveduras foi drasticamente afetada, chegando a um valor de 50% de células viáveis. Isso ocorre pois a LAB homofermentativa produz apenas ácido láctico, o que diminui o pH do meio e acaba por prejudicar o crescimento e viabilidade da levedura no decorrer do tempo. Esses dados estão em concordância com os resultados obtidos por Basso et al. (2014), onde foi observado que quando bactéria e levedura foram inoculadas em concentrações iguais, a LAB homofermentativa foi mais prejudicial, reduzindo a viabilidade da levedura para 65%, devido às altas concentrações de ácido láctico produzidas indicado também pela queda no pH de 4,94 com apenas a levedura para 3,53 em co-cultivo com a LAB homofermentativa.

Pode também ser observado que no tratamento apenas com a heterofermentativa, a viabilidade foi de 71% em 24h de co-cultivo. As leveduras possivelmente tiveram melhor desempenho no cultivo apenas com a presença de heterofermentativas visto que possuem metabólitos em comum, onde ambas estão adaptadas, como o etanol. No tratamento apenas com a levedura em combinação com os inibidores (HMF e furfural) foi possível notar que a viabilidade de células chegou a valor próximo de 95%, indicando a *S. cerevisiae* resistente as concentrações de inibidores testadas.

Figura 38. Viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos 4 tratamentos. A) *L. fermentum* + *S. cerevisiae*, B) *L. plantarum* + *S. cerevisiae*, C) *L. fermentum* + *L. plantarum* + *S. cerevisiae* ; D) *S. cerevisiae* na presença de inibidores. Teste Tukey realizado com 95% de

confiança , as letras iguais em cada barra indicam tratamentos onde não houve diferença significativa e as letras diferentes indicam tratamentos onde houve diferença significativa.

Fonte: autora

5.5.2. Cinética de consumo de substratos e formação de produtos

A partir da cinética de substratos e produtos, foi possível notar que na presença da LAB heterofermentativa houve o consumo mais rápido da glicose. Isso se deve pois a LAB heterofermentativa tem a capacidade de detoxificar o meio com HMF e furfural. Foi possível notar também que no co-cultivo da levedura com a LAB homofermentativa, como ela não tem a capacidade de detoxificar o meio, a produção de etanol se deu de maneira mais lenta no início, e após a levedura detoxificar o meio, a produção do etanol começou a subir de forma mais rápida. Além disso, a LAB homofermentativa como só realiza a produção de ácido láctico, representa uma fonte a mais de inibição para a levedura, acidificando o meio, chegando a concentração final de 8,7g/L no tratamento apenas com *L. plantarum*, tornado as condições de cultivo menos favoráveis a *S. cerevisiae*.

Após a levedura se adaptar a presença do HMF e furfural, também foi possível observar um consumo acelerado de glicose, fato também relatado por Taherzadeh et al., (2000) e Liu et al., (2004). Como a levedura tolerante é capaz de realizar a detoxificação *in situ*, ocorre a geração de mais NADP⁺ que acelera a biossíntese e o crescimento celular (Liu, 2021). Além disso, a enzima álcool

desidrogenase é favorecida a converter acetaldeído a etanol, visto que a detoxificação gera um suprimento de NAD⁺ para tanto, fatores que contribuem para o acelerado consumo de glicose (Liu, 2009).

Tabela 8. Concentração final em g/L dos metabólitos e substratos em cada um dos tratamentos após 24h de co-cultivo. A) *L. fermentum* + *S. cerevisiae*, B) *L. plantarum* + *S. cerevisiae*, C) *L. fermentum* + *L. plantarum* + *S. cerevisiae* ; D) *S. cerevisiae* na presença de inibidores

	A	B	C	D
Glicose	0,050 ± 0,0098	0,437 ± 0,468	0,0517 ± 0,012	0,875 ± 1,008
Lactato	6,135 ± 0,661	8,698 ± 1,043	6,651 ± 0,309	-
Glicerol	1,526 ± 0,189	0,26 ± 0,247	1,259 ± 0,008	0,85 ± 0,074
Acetato	1,048 ± 0,019	0,282 ± 0,08	0,938 ± 0,039	0,333 ± 0,022
HMF	0,024 ± 0,002	0,566 ± 0,033	0,02	0,501 ± 0,09
Furfural	0	0,009 ± 0,008	0	0,008 ± 0,007
Etanol	6,422 ± 1,148	4,794 ± 0,668	5,394 ± 0,182	8,433 ± 0,573

Fonte: autora

Figura 39. Cinética de consumo de açúcares e produção dos metabólitos para os 4 tratamentos propostos. A) *L. fermentum* E3 + *S. cerevisiae*, B) *L. plantarum* E4 + *S. cerevisiae*, C) *L. fermentum* E3 + *L. plantarum* E4 + *S. cerevisiae* e D) *S. cerevisiae* na presença de inibidores

Fonte: autora

O glicerol é um subproduto da levedura que está diretamente relacionado com o equilíbrio do balanço de óxido-redução (redox), pois a fermentação alcoólica é um processo de balanço redox neutro, e para manter esse balanço, todo o NADH formado em reações de oxidação (da produção de biomassa e formação de ácidos orgânicos) deve ser consumido em reações de redução, acoplada a produção de glicerol (Blomberg, Adler, 1992; Van-Dijken, Scheffers, 1986). Adicionalmente, o glicerol é um metabólito osmorregulador, e sua formação é aumentada quando

existe uma alta pressão osmótica no meio, protegendo as células do estresse osmótico (Guo et al., 2011). Foi possível notar um aumento da produção de glicerol pela levedura quando na presença das bactérias, em acordo com o que já havia sido relatado por Meikle et al. 1988. No entanto, no cultivo apenas com LAB homofermentativa, observou-se a diminuição do glicerol, com concentração final de 0,26g/L, diferentemente do observado para o cultivo na presença de *L. fermentum* (1,53g/L) e na presença de ambas (1,26g/L). A hipótese sugerida por Lino (2021) na LAB homofermentativa, como a *L. amylovorus* testada, é de que ocorra uma menor de produção de glicerol pela levedura pois ela faz o uso do acetaldeído produzido pelas bactérias para reoxidar o NADH, não se valendo mais da rota do glicerol para tal feito. Dessa forma, a bactéria se aproveita de um nicho metabólico exclusivo criado pela levedura o que pode ter levado a queda de sua viabilidade pois sua rota de balanceamento redox através do glicerol foi suprimida.

Figura 40. Cinética de detoxificação do A) Furfural e B) HMF para os 4 tratamentos propostos.

Fonte: autora

O furfural e o HMF são aldeídos quimicamente ativos e durante a fermentação, a presença de furfural, mesmo a baixas concentrações pode afetar a viabilidade das células e a taxa de crescimento específico das leveduras, pois as enzimas da via glicolítica são sensíveis a estes compostos (Allen et al., 2010) (Palmqvist et al., 1999). Algumas cepas de *S. cerevisiae* já foram descritas como capazes de reduzir esses aldeídos aos seus álcoois correspondentes, que representam menos toxicidade ao crescimento da levedura. A detoxificação dos aldeídos furânicos aos álcoois correspondentes ocorre através da reoxidação de NADH pela enzima ADH1 ou de NADPH, através das enzimas ADH6, ADH7, FFR e XR (Liu, 2009).

Figura 41. Rota de detoxificação simplificada do furfural e HMF em leveduras

Fonte: adaptado de Liu, 2009

No entanto, é possível notar que a detoxificação da levedura é mais lenta que a da LAB heterofermentativa. Liu et al., 2011 identificaram que a superexpressão de enzimas como ADH6 e ADH7 aumentaram a capacidade redutiva da levedura para HMF e furfural, mostrando atividade de aldeído redutase quase 100x mais intensa que sua atividade oxidativa, indicando a possibilidade de que sua função metabólica prioritária é mais como aldeído redutase que álcool desidrogenase, quando na presença dos inibidores (Liu, 2009). Mutantes com a superexpressão de ADH1, também mostraram alta atividade de aldeído redutase (Almeida et al.2008)

6. CONCLUSÕES

Avaliando o comportamento das bactérias lácticas na presença dos diferentes açúcares provenientes da etapa de pré-tratamento foi observado que apenas as LAB heterofermentativas possuem a capacidade de metabolizar a xilose (principal componente derivado das hemiceluloses). Dessa forma, supõem-se que em uma fermentação 2G, as bactérias heterofermentativas estarão em maior quantidade por serem capazes de utilizar a principal pentose como fonte de carbono.

Ao serem avaliados os três principais grupos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos (ácidos orgânicos, compostos fenólicos e derivados furânicos) em bactérias lácticas, foi observado o efeito deletério dos ácidos acético, levulínico e fórmico, sendo este último o mais prejudicial sobre a máxima velocidade específica. O composto fenólico estudado foi o ácido cumárico e foi possível observar o efeito negativo em todas as bactérias lácticas estudadas, mas com efeitos menos deletérios que os evidenciados nos ácidos orgânicos.

De forma inesperada, os derivados furânicos agiram de maneiras opostas em bactérias lácticas de metabolismo homofermentativo e heterofermentativo. Nas primeiras o efeito negativo foi evidenciado com a diminuição da máxima velocidade específica, diferentemente do que ocorreu nas bactérias lácticas heterofermentativas, que sofreram um aumento na máxima velocidade específica.

Estudos adicionais de cinética foram realizados com esses inibidores para a verificação do comportamento do metabolismo diante deles. Através de análises cromatográficas, foi possível observar a diminuição dos compostos furfural e HMF, o que pode sugerir que essas bactérias heterofermentativas estejam detoxificando o meio, transformando-os de sua forma aldeído em seus respectivos álcoois. A abordagem da bio-detoxificação do caldo de fermentação dispensa um processo de desintoxicação do licor hemicelulósico antes da fermentação e expande a possibilidade de produção de ácido láctico a partir da matéria-prima de segunda geração.

Foram também realizados estudos de co-cultivo das bactérias lácticas com a levedura na presença de HMF e furfural, indicando que as LAB heterofermentativas detoxificam o meio mais rapidamente, possibilitando com que a levedura fermente os açúcares a etanol. As LAB homofermentativas representaram outra fonte de

estresse para a levedura, visto que além de não serem capazes de detoxificar o meio, tornam o ambiente mais hostil pela produção de ácido láctico.

Ainda será necessário um estudo mais aprofundado para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos e vias bioquímicas responsáveis pelas respostas dos inibidores nas bactérias pode permitir o desenvolvimento de novas cepas geneticamente modificadas para suportar os principais inibidores gerados a partir do pré-tratamento da biomassa.

7. REFERÊNCIAS¹

- ALLEN, Sandra A. et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.
- ALIZADEH, Hasan et al. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1133-1141, 2005.
- ALMEIDA, João RM et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALVIRA, Petal et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- AMARAL, Aurélio. Regulação do RenovaBio. **RENOVABIO: Próximos Passos**. Rio de Janeiro: FGV Energia, 2018.
- AMORIM, Henrique V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267, 2011.
- AXE, Douglas D.; BAILEY, James E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 1, p. 8-19, 1995.
- BAI, Zhongzhong et al. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on the growth and D-lactic acid production of *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 10, p. 1993-2001, 2015.
- BALAT, Mustafa; BALAT, Havva; ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy conversion and management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

- BASSO, Luiz C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, Luiz Carlos; BASSO, Thiago Olitta; ROCHA, Saul Nitsche. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production-recent developments and prospects**, v. 1530, p. 85-100, 2011.
- BASSO, Thiago Olitta *et al.* Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 169-177, 2014.
- BEREZINA, Oksana V. *et al.* Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 635-646, 2010.
- BERNARDES, Marco Aurelio Dos Santos (Ed.). **Biofuel Production: Recent Developments and Prospects**. BoD–Books on Demand, 2011.
- BHALLA, Aditya et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource technology**, v. 128, p. 751-759, 2013.
- BLOMBERG, Anders; ADLER, Lennart. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in microbial physiology**, v. 33, p. 145-212, 1992.
- BOGUTA, Anna Monika et al. Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstocks. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 97, 2014.
- BONATELLI, Maria L. et al. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. **FEMS microbiology letters**, v. 364, n. 17, p. fnx159, 2017.
- BONOMI, Antonio; MAIORANO, Alfredo Eduardo; FILOMENA, MAR. Técnica aproveita lignocelulose da cana para produzir etanol. **Visão Agrícola**, v. 8, p. 29-33, 2008.

- BOSMA, Elleke F.; FORSTER, Jochen; NIELSEN, Alex Toftgaard. *Lactobacilli* and *pediococci* as versatile cell factories—Evaluation of strain properties and genetic tools. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 4, p. 419-442, 2017.
- BOUDET, Alain M. et al. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in plant science**, v. 8, n. 12, p. 576-581, 2003.
- BREXÓ, Ramon Peres; SANT'ANA, Anderson S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.
- BRODEUR, Gary et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, v. 2011, 2011.
- BUCHERT, Johanna et al. Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. **Process biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 176-180, 1990.
- BUCKERIDGE, Marcos S. et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a 'midway' strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **GCB Bioenergy**, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2012.
- BUSTOS, Guadalupe et al. Influence of the metabolism pathway on lactic acid production from hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates using *Lactobacillus pentosus*. **Biotechnology progress**, v. 21, n. 3, p. 793-798, 2005.
- CANILHA, Larissa et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.
- CARNEIRO, Livia Melo. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- CARVALHO, Danilo José et al. Assessment of the self-sustained energy generation of an integrated first and second generation ethanol production from sugarcane through the characterization of the hydrolysis process residues. **Energy Conversion and Management**, v. 203, p. 112267, 2020.
- CARVALHEIRO, Florbela; DUARTE, Luís C.; GÍRIO, Francisco M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, p. 849-864, 2008.
- CHAILLOU, Stéphane et al. Molecular Cloning and Functional Expression in *Lactobacillus plantarum* 80 of xylT, Encoding the d-Xylose-H⁺ Symporter of *Lactobacillus brevis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4720-4728, 1998.
- CHANDEL, Anuj K.; DA SILVA, Silvio Silvério; SINGH, Om V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *BioEnergy Research*, v. 6, n. 1, p. 388-401, 2013.
- COLA, Priscila et al. Differential effects of major inhibitory compounds from sugarcane-based lignocellulosic hydrolysates on the physiology of yeast strains and lactic acid bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 4, p. 571-582, 2020.
- COLOMBI, Bruna Lyra et al. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Embrapa Florestas- Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.
- COLLOGRAI, Karen Cristina; DA COSTA, Aline Carvalho; IENCZAK, Jaciane Lutz. Effect of contamination with *Lactobacillus fermentum* I2 on ethanol production by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 12, p. 5039-5050, 2019.
- CONAB. Levantamento da safra 2020/21 de cana-de-açúcar. Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> - Acesso em 31 de agosto de 2020.
- CORSETTI, A.; PRETE, R.; GARCIA-GONZALEZ, Natalia. Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. 2018.

- CORTEZ, Luís Augusto Barbosa (Ed.). Proálcool 40 anos: Universidades e empresas: 40 anos de ciência e tecnologia para o etanol brasileiro. Editora Blucher, 2018.
- COSTA, Ohana Yonara Assis et al. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 42, n. 1, p. 73-84, 2015.
- DA SILVA-FILHO, Eurípedes Alves et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2005.
- DATTA, Ambarish; MANDAL, Bijan Kumar. Impact of alcohol addition to diesel on the performance combustion and emissions of a compression ignition engine. **Applied thermal engineering**, v. 98, p. 670-682, 2016.
- DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. ***Lactobacillus* spp.: general characteristics**. 2016.
- DELGENÈS, Jean-Philippe; MOLETTA, Renato; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and microbial technology**, v. 19, n. 3, p. 220-225, 1996.
- DE MAN, J. C.; ROGOSA, d M.; SHARPE, M. Elisabeth. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- DE OLIVEIRA LINO, Felipe Senne et al. Strain dynamics of specific contaminant bacteria modulate the performance of ethanol biorefineries. *bioRxiv*, 2021.
- DE OLIVEIRA LINO, Felipe Senne et al. Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.
- DESSIE, Wubliker et al. Inhibitory effects of lignocellulose pretreatment degradation products (hydroxymethylfurfural and furfural) on succinic acid producing *Actinobacillus succinogenes*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150, p. 107263, 2019.

- DIAS, Marina OS et al. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. **Fuel Processing Technology**, v. 109, p. 84-89, 2013.
- DUNLOP, A. P. Furfural formation and behavior. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 204-209, 1948.
- FERREIRA, Vitor Francisco; ROCHA, David Rodrigues da; SILVA, Fernando de Carvalho da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.
- FIRMINO, Fernanda C. et al. Characterization of microbial communities in ethanol biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 183-195, 2020.
- G-ALEGRÍA, Eva *et al.* High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 53-61, 2004.
- GALLO, Claudio Rosa et al. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. (Universidade Estadual de Campinas), 1990.
- GALVAO, A. C. F. *et al.* Second generation sugarcane bioenergy and biochemicals: advanced low-carbon fuels for transport and industry. **Center for Strategic Studies and Management (CGEE), Brasília**, v. 103, 2016.
- GÄNZLE, Michael; FOLLADOR, Rainer. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 340, 2012.
- GÄNZLE, Michael G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015.
- GODOY, A. et al. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International sugar journal**, v. 110, n. 1311, 2008.

- GUBELT, Angela et al. Comparison of Different Lactobacilli Regarding Substrate Utilization and Their Tolerance Towards Lignocellulose Degradation Products. **Current Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3136-3146, 2020.
- GUO, Zhong-peng et al. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic engineering**, v. 13, n. 1, p. 49-59, 2011.
- GUTIÉRREZ, Tony et al. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, 2002. p. 327-340.
- HAMELINCK, Carlo N.; VAN HOOIJDONK, Geertje; FAAIJ, Andre PC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. **Biomass and bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.
- HASUNUMA, Tomohisa; KONDO, Akihiko. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1207-1218, 2012.
- HAHN-HÄGERDAL, Bärbel *et al.* Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.
- HELANTO, M. et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for production of L-ribulose. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 21, p. 7083-7091, 2007.
- HSU, T.; LADISCH, R.; TSAO, G. Alcohol from cellulose. **Chem. Intermed**, v. 1203, n. 3, p. 3, 1980.
- IBGE, Censo Agro 2017 – Disponível em https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76434. Acesso em 25 de março de 2020.
- JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

- KANG, Li; WANG, Wei; LEE, Yoon Y. Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 53-66, 2010.
- KANG, Tae Sun; KORBER, Darren R.; TANAKA, Takuji. Regulation of dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 24, p. 7818-7826, 2013.
- KANDLER, Otto. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 3, p. 209-224, 1983.
- KLINKE, Helene B. et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 82, n. 1, p. 15-26, 2002.
- KLINKE, Helene Bendstrup; THOMSEN, A. B.; AHRING, Birgitte Kiær. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10-26, 2004.
- KOHLHEPP, Gerd. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.
- LEE, Jeewon. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.
- LEITE, Rogério Cezar de Cerqueira; **Biomassa, a esperança verde para poucos**, 2005 Disponível em: <http://www.agrisustentavel.com/san/biomassa.htm> .Acesso em 14/09/2020
- LEITE, Rogério Cezar de Cerqueira; LEAL, Manoel Régis LV. **O biocombustível no Brasil**. Novos estudos CEBRAP, n. 78, p. 15-21, 2007.
- LEITE, RC de C. et al. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. **CGEE, Brasilia, DF, Brazil, Coordinated by Rogério CC Leite**, Brasília, DF, 536p, 2009.
- LEROI, Françoise; PIDOUX, M. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. **Journal of applied bacteriology**, v. 74, n. 1, p. 54-60, 1993.

- LIN, Feng-Ming; QIAO, Bin; YUAN, Ying-Jin. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 11, p. 3765-3776, 2009.
- LIU, Siqing et al. Functional expression of the thiolase gene thl from *Clostridium beijerinckii* P260 in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus buchneri*. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 283-288, 2010.
- LIU, Shijie. **Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design**. Elsevier, 2017
- LIU, Z. Lewis; SLININGER, Patricia J.; GORSICH, Steve W. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1-3, p. 451-460, 2005.
- LIU, Z. Lewis. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809-825, 2011.
- LIU, Z. Lewis. Reasons for 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: current state of knowledge and perspectives for further improvements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-17, 2021.
- LITCHFIELD, J.H. Lactic acid, Microbially produced. **Appl. Microbiol.**, p. 362-372, 2009.
- LOPES, A.R. **Produção de ácido láctico por *Lactobacillus* em diferentes meios de cultivo**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2008.
- LORENZI, Bruno Rossi et al. **Etanol de segunda geração no Brasil: política e translações**. 2018.
- LORENZI, Bruno Rossi; ANDRADE, Thales Haddad Novaes de. O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO NO BRASIL: POLÍTICAS E REDES SOCIOTÉCNICAS. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, n. 100, 2019

- LUCENA, Brigida TL et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.
- MAICAS, Sergi; FERRER, Sergi; PARDO, Isabel. NAD (P) H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. **Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 325-332, 2002.
- MEHER, L. C. ; SAGAR, D. Vidya; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.
- MEIKLE, Amanda J.; REED, Robert H.; GADD, Geoffrey M. Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 134, n. 11, p. 3049-3060, 1988.
- MILANEZ, Artur Yabe et al. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **BNDES Setorial**, n. 35, mar. 2012, p. 277-302, 2012.
- MILLER, Elliot N. et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 19, p. 6132-6141, 2009.
- MODIG, Tobias; LIDÉN, Gunnar; TAHERZADEH, Mohammad J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, n. 3, p. 769-776, 2002.
- MOOD, Sohrab Haghighi et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOSIER, Nathan et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- MUTHAIYAN, Arunachalam; LIMAYEM, Alya; RICKE, Steven C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351-370, 2011.

- NARENDRANATH, N. V. et al. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 11, p. 4158-4163, 1997.
- NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. The alcohol textbook, v. 4, p. 287-298, 2003.
- NIJU, S.; SWATHIKA, M.; BALAJII, M. Pretreatment of lignocellulosic sugarcane leaves and tops for bioethanol production. In: **Lignocellulosic biomass to liquid biofuels. Academic Press**, 2020. p. 301-324.
- NOGUEIRA, Luiz Augusto et al. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, RJ: BNDES, CGEE, 2008.
- OKANO, Kenji et al. D-lactic acid production from cellooligosaccharides and β -glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 643-650, 2010.
- OLIVA NETO, P. de et al. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 25-31, 1997.
- OLSSON, Lisbeth; NIELSEN, Jens. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517-522, 1997.
- PALMQVIST, Eva; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000a.
- PAMPULHA, M. Elisa; LOUREIRO-DIAS, Maria C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology letters**, v. 184, n. 1, p. 69-72, 2000.
- PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production. **Critical reviews in biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 20-31, 2011.

- PARISUTHAM, Vinuselvi; KIM, Tae Hyun; LEE, Sung Kuk. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. **Bioresource technology**, v. 161, p. 431-440, 2014.
- PARK, Jeung-yil et al. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw–calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. **Bioresource technology**, v. 101, n. 17, p. 6805-6811, 2010.
- PATEL, Milind A. et al. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3228-3235, 2006.
- PHILIPPIDIS, G. The potential of biofuels in the Americas. **Energy**, 2008.
- PONOMAROVA, Olga *et al.* Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. **Cell systems**, v. 5, n. 4, p. 345-357. e6, 2017.
- Portal da União da Indústria de Cana de açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em 03/12/2018.
- RABELO, Sarita Cândida; DA CRUZ PRADELLA, José Geraldo; IENCZAK, Jaciane Lutz. Produção de etanol de segunda geração. **Biotecnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**, v. 3, p. 107, 2019.
- RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Current methodologies and advances in bio-ethanol production. **J Biotechnol Biores**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2018.
- RAVEN, Peter H. et al. Biology of plants. Macmillan, 2005.
- RUBIN, Edward M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.
- SAKIMOTO, Kouki; KANNA, Machi; MATSUMURA, Yukihiro. Kinetic model of cellulose degradation using simultaneous saccharification and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 99, p. 116-121, 2017.
- SALEHI JOUZANI, Gholamreza; TAHERZADEH, Mohammad J. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 1, p. 152-195, 2015.

- SANTOS, Billy Manoel dos. **Identificação molecular de bactérias lácticas presentes no caldo de cana-de-açúcar**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, Fernando et al. Production of second-generation ethanol from sugarcane. In: **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. Academic Press, 2020. p. 195-228.
- SCHELL, Daniel J. et al. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Bioresource technology**, v. 98, n. 15, p. 2942-2948, 2007.
- SINDHU, Raveendran; BINOD, Parameswaran; PANDEY, Ashok. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. **Bioresource technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.
- SINGH, Anita; BISHNOI, Narsi R. Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1785-1793, 2012.
- SJÖSTRÖM, Eero. Carbohydrate degradation products from alkaline treatment of biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 61-64, 1991.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar tech**, v. 11, n. 2, p. 109-123, 2009.
- SOLOMON, Barry D.; JOHNSON, Nicholas H. Valuing climate protection through willingness to pay for biomass ethanol. **Ecological Economics**, v. 68, n. 7, p. 2137-2144, 2009.
- SUN, Runcang; LAWOTHER, J. Mark; BANKS, W. B. Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. **Carbohydrate polymers**, v. 29, n. 4, p. 325-331, 1996.
- TAHERZADEH, Mohammad J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701-708, 2000.

- TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.
- TANAKA, K. et al. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1, p. 160-167, 2002.
- TIAN, Shen et al. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 5, p. 656-660, 2009.
- THOMAS, Kolothumannil C.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.
- TOOR, Manju et al. An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Chemosphere**, v. 242, p. 125080, 2020.
- ULMER, Helge M.; GÄNZLE, Michael G.; VOGEL, Rudi F. Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1. 460. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 3966-3973, 2000.
- UNICA, Produção e uso do etanol combustível no Brasil – Respostas às questões mais frequentes. União da Indústria de Cana de açúcar. 2007 – Disponível em www.unica.com.br – Acesso em 26/05/2020.
- VAN DER POL, Edwin C. et al. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 23, p. 9579-9593, 2014.
- VAN DER POL, Edwin et al. Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment. **Bioresource technology**, v. 181, p. 114-123, 2015.

- VAN DER POL, Edwin C. et al. Identifying inhibitory effects of lignocellulosic by-products on growth of lactic acid producing micro-organisms using a rapid small-scale screening method. **Bioresource technology**, v. 209, p. 297-304, 2016.
- VAN DIJKEN, Johannes P.; SCHEFFERS, W. Alexander. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology reviews**, v. 1, n. 3-4, p. 199-224, 1986.
- VAN NIEL, Ed WJ *et al.* The potential of biodetoxification activity as a probiotic property of *Lactobacillus reuteri*. **International journal of food microbiology**, v. 152, n. 3, p. 206-210, 2012.
- VAN MARIS, Antonius JA *et al.* Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.
- VAZ JR, Sílvio. Biorrefinarias: cenários e perspectivas. **Embrapa Agroenergia**, v. 176, 2011.
- VERDUYN, Cornelis. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. In: **Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms**. Springer, Dordrecht, 1992. p. 325-353.
- VERTÈS, Alain A. et al. (Ed.). **Biomass to biofuels: strategies for global industries**. John Wiley & Sons, 2011.
- VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 22, n. 2, p. 245-264, 2008.
- VINAY-LARA, Elena et al. *Lactobacillus casei* as a biocatalyst for biofuel production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 9, p. 1205-1213, 2016.
- VON SIVERS, Margareta et al. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, v. 10, n. 5, p. 555-560, 1994.

- WANG, Xuan et al. Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 10, p. 4021-4026, 2013.
- WISCHRAL, Daiana et al. Lactic acid production from sugarcane bagasse hydrolysates by *Lactobacillus pentosus*: Integrating xylose and glucose fermentation. *Biotechnology progress*, v. 35, n. 1, p. e2718, 2019.
- WISSELINK, H. W. et al. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 151-161, 2002.
- YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Rev Microbiol**, v. 22, n. 1, p. 12-16, 1991.
- ZHANG, Jiayi; LYND, Lee R. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. **Biotechnology and bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 235-244, 2010.
- ZHANG, Jingzhi et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. In: **Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels**. **Academic Press**, 2020. p. 17-65.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

ANEXOS

Tabela 9. Comparativo de crescimento relativo com HMF e furfural em diversas concentrações obtidas de outros trabalhos na área

Microrganismo	inibidor (pH)	concentração	crescimento relativo (%)	Referência
<i>K. marxianus</i>	furfural	2,53 g/L	50	Oliva et al. 2003
<i>Z. mobilis</i>	furfural	1,6 g/L	50	Franden et al. 2009
<i>S. cerevisiae</i>	furfural	4 g/L	11	Taherzadeh et al. 2000
<i>E. coli</i>	furfural	3,4 g/L	50	Boopathy et al. 1993
<i>S. cerevisiae</i>	furfural	0,5 g/L	53	Delgenes et al. 1996
<i>S. cerevisiae</i>	furfural	1 g/L	19	
<i>Z. mobilis</i>	furfural	1 g/L	81	
<i>Z. mobilis</i>	furfural	2g/L	44	
<i>L. casei</i>	furfural	0,25	102	van der Pol et al. 2016
<i>L. casei</i>	furfural	0,5	99	
<i>L. casei</i>	furfural	0,75	97	
<i>L. casei</i>	furfural	1	84	
<i>L. casei</i>	furfural	2,5	57	
<i>L. casei</i>	furfural	5	11	
<i>L. delbrueckii</i>	furfural	0,25	115	
<i>L. delbrueckii</i>	furfural	0,5	110	
<i>L. delbrueckii</i>	furfural	0,75	103	
<i>L. delbrueckii</i>	furfural	1	72	
<i>L. delbrueckii</i>	furfural	2,5	6	
<i>L. delbrueckii</i>	furfural	5	4	
<i>L. lactis</i>	furfural	0,25	115	
<i>L. lactis</i>	furfural	0,5	113	
<i>L. lactis</i>	furfural	0,75	94	
<i>L. lactis</i>	furfural	1	80	
<i>L. lactis</i>	furfural	2,5	37	
<i>L. lactis</i>	furfural	5	7	
<i>B. coagulans</i>	furfural	0,25	103	Gubelt et al. 2020
<i>B. coagulans</i>	furfural	0,5	94	
<i>B. coagulans</i>	furfural	0,75	20	
<i>B. coagulans</i>	furfural	1	7	
<i>B. coagulans</i>	furfural	2,5	-1	
<i>B. coagulans</i>	furfural	5	0	
<i>B. smithii</i>	furfural	0,25	106	
<i>B. smithii</i>	furfural	0,5	107	
<i>B. smithii</i>	furfural	0,75	102	
<i>B. smithii</i>	furfural	1	47	
<i>B. smithii</i>	furfural	2,5	1	Gubelt et al. 2020
<i>B. smithii</i>	furfural	5	2	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	furfural (4)	4	90	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	furfural (4)	2,7	50	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	furfural (4)	1,5	10	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	furfural (6)	7,3	90	Gubelt et al. 2020
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	furfural (6)	3,7	50	

<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	furfural (6)	1,2	10	
<i>Lactobacillus fermentum</i> E3	furfural	2,5	99	este trabalho
<i>Lactobacillus plantarum</i> E4	furfural	2,5	87	
<i>K. marxianus</i>	HMF	4,01	50	Oliva et al. 2003
<i>Z. mobilis</i>	HMF	2,8	50	Franden et al. 2009
<i>Z. mobilis</i>	HMF	8	0	Franden et al. 2009
<i>S. cerevisiae</i>	HMF	2	60	Taherzadeh et al. 2000
<i>S. cerevisiae</i>	HMF	4	29	Taherzadeh et al. 2000
<i>E. coli</i>	HMF	2,7	50	Boopathy et al. 1993
<i>S. cerevisiae</i>	HMF	1	35	
<i>S. cerevisiae</i>	HMF	3	17	Delgenes et al. 1996
<i>Z. mobilis</i>	HMF	3	69	
<i>Z. mobilis</i>	HMF	5	33	
<i>L. casei</i>	HMF	0,25	95	
<i>L. casei</i>	HMF	0,5	96	
<i>L. casei</i>	HMF	0,75	93	
<i>L. casei</i>	HMF	1	81	
<i>L. casei</i>	HMF	2,5	41	
<i>L. casei</i>	HMF	5	7	
<i>L. delbrueckii</i>	HMF	0,25	102	
<i>L. delbrueckii</i>	HMF	0,5	109	
<i>L. delbrueckii</i>	HMF	0,75	93	
<i>L. delbrueckii</i>	HMF	1	96	
<i>L. delbrueckii</i>	HMF	2,5	12	
<i>L. delbrueckii</i>	HMF	5	5	
<i>L. lactis</i>	HMF	0,25	105	van der Pol et al. 2016
<i>L. lactis</i>	HMF	0,5	103	
<i>L. lactis</i>	HMF	0,75	89	
<i>L. lactis</i>	HMF	1	91	
<i>L. lactis</i>	HMF	2,5	39	
<i>L. lactis</i>	HMF	5	4	
<i>B. coagulans</i>	HMF	0,25	115	
<i>B. coagulans</i>	HMF	0,5	1,15	
<i>B. coagulans</i>	HMF	0,75	118	
<i>B. coagulans</i>	HMF	1	111	
<i>B. coagulans</i>	HMF	2,5	29	
<i>B. coagulans</i>	HMF	5	3	
<i>B. smithii</i>	HMF	0,25	89	
<i>B. smithii</i>	HMF	0,5	84	
<i>B. smithii</i>	HMF	0,75	70	
<i>B. smithii</i>	HMF	1	48	
<i>B. smithii</i>	HMF	2,5	-1	van der Pol et al. 2016
<i>B. smithii</i>	HMF	5	10	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	HMF (4)	8,5	50	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	HMF (4)	5,8	10	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	HMF (6)	9,2	90	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	HMF(6)	7,9	50	
<i>Lactobacillus brevis</i> IGB 1.29	HMF (6)	6,6	10	
<i>Lactobacillus fermentum</i> E3	HMF	4	104	este trabalho
<i>Lactobacillus plantarum</i> E4	HMF	4	62	este trabalho