PRISCILA COLA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE LEVEDURAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL A
INIBIDORES PROVENIENTES DO PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL
LIGNOCELULÓSICOS DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR**

SÃO PAULO

2018

PRISCILA COLA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE LEVEDURAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL A
INIBIDORES PROVENIENTES DO PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL
LIGNOCELULÓSICOS DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2018

PRISCILA COLA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE LEVEDURAS DA PRODUÇÃO DE ETANOL A
INIBIDORES PROVENIENTES DO PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL
LIGNOCELULÓSICOS DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

SÃO PAULO

2018

À Deus por tudo que eu sou e tenho.

*Aos meus pais, Vera e Waldecir, e minha irmã, Fabíula, pelo amor, exemplo e
paciência.*

Aos amigos queridos que fizeram esta etapa da vida mais divertida e leve.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Thiago Olitta Basso pela confiança, orientação, paciência e empenho no desenvolvimento deste trabalho, sem ele não seria possível.

Ao futuro doutor, Ms. Bruno Labate Vale da Costa, pelos ensinamentos de metodologia em cromatografia líquida.

À Dra. Fabíola Aliaga de Lima pela doce amizade construída e pelas dúvidas tiradas.

À Ma. Dielle Pierotti Procópio e Adriana Tabosa pelos cultivos compartilhados e pela companhia no laboratório.

À Dra. Maria Anita Mendes e a Dra. Meriellen Dias Dipré pelas análises de identificação de microrganismos via metodologia MALDi-Biotyper.

Ao Felipe Senne de Oliveira Lino pelas análises de identificação de microrganismos via metodologia 16S.

À todos do Laboratório de biotecnologia do segundo andar do prédio semi-industrial do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos"
(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

COLA, P. Respostas fisiológicas de leveduras da produção de etanol a inibidores provenientes do pré-tratamento do material lignocelulósicos do bagaço da cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica – Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2018.

É esperado que a produção de combustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos alcance representatividade na matriz energética mundial. Neste cenário, leveduras desempenharão importante papel como plataformas microbianas para os processos de conversão dos açúcares derivados da biomassa em etanol (de segunda geração) e em outros produtos de interesse. Apesar dos avanços consideráveis na área, a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos ainda apresenta alguns desafios científicos e tecnológicos, como por exemplo, os problemas enfrentados na fermentação devido à presença de diversos inibidores oriundos dos processos de pré-tratamento e hidrólise da biomassa (tais como furaldeídos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos). A geração destes inibidores reduz consideravelmente a eficiência da etapa fermentativa, e muitas vezes, inviabiliza o processo como um todo. Neste contexto, o presente trabalho estudou a identificação dos principais compostos lignocelulósicos inibidores na fermentação por leveduras presentes em cinco amostras de hidrolisados industriais. Ácido glicólico e ácido acético, dentre os ácidos orgânicos foram identificados em todas as amostras analisadas. Em relação aos furaldeídos, foram detectados furfural e 5- hidroximetil-furfural (HMF) em todas as amostras analisadas. Os principais e mais abundantes compostos fenólicos identificados pelo sistema foram ácido *p*-cumárico (em 4 de 5), ácido ferúlico (em 3 de 5) e ácido vanílico (em 3 de 5). Tendo os principais compostos quantificados e identificados, realizou-se um estudo de mínimas e máximas concentrações de alguns destes inibidores em quatro diferentes linhagens laboratoriais e industriais (CEN.PK113-7D, CEN.PK112, SA-1 e JAY270), a fim de verificar a toxicidade dos mesmos frente aos principais parâmetros cinéticos da fermentação (fase lag, $\mu_{\text{máx}}$, produção de biomassa e etanol). De forma geral, a linhagem industrial *S. cerevisiae* SA-1 se mostrou mais tolerante frente às demais linhagens, em praticamente todas as condições analisadas. Visto que a presença de algumas bactérias nas linhas de produção de etanol é sabida, procurou-se verificar a resistência destas na presença

dos compostos inibitórios. Ao comparar a resistência frente aos inibidores entre bactérias lácticas e leveduras laboratoriais e industriais, notou-se uma potencial robustez das bactérias frente às leveduras, uma vez que as últimas foram incapazes de crescer no meio de cultivo acrescido de um coquetel de inibidores, enquanto que as bactérias apresentaram crescimento. Por fim, investigou-se a influência conjunta de três compostos inibitórios (ácido acético, HMF e ácido *p*-cumárico) sobre os principais parâmetros fisiológicos da linhagem SA-1, a mais tolerante das linhagens avaliadas. Assim, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), pode-se analisar estatisticamente os efeitos dos três inibidores, com o qual verificou-se que a maior toxicidade (redução da velocidade específica de crescimento) é exercida pelo HMF. De uma maneira geral, a linhagem SA-1 pode ser considerada uma plataforma microbiana com grande potencial de aplicação na produção de etanol de segunda geração, bem como no estudo das bases moleculares para tolerância aos inibidores oriundos desses processos.

Palavras-chave: *S. cerevisiae*, bactérias lácticas, etanol 2G, inibidores lignocelulósicos, processos fermentativos.

ABSTRACT

COLA, P. Physiological responses of yeasts from ethanol production to inhibitors arising from pre-treatment of lignocellulosic materials from sugarcane bagasse. Dissertation (Master's degree) – Polytechnic School – Department of Chemical Engineering, Polytechnic School of the University of São Paulo, 2018.

It is expected that the production of fuels from lignocellulosic residues will be representative in the world energy matrix. In this scenario, yeasts will play an important role as microbial platforms for the conversion processes of sugars derived from biomass into ethanol and other products of interest. Despite the considerable advances in the area, the fermentation of lignocellulosic hydrolysates still presents some scientific and technological challenges, such as the problems faced in the fermentation due to the presence of several inhibitors from the processes of pretreatment and hydrolysis of biomass (such as furaldehydes, phenolic compounds and organic acids). The presence of these inhibitors considerably reduces the efficiency of the fermentation step, and often hampers the process itself. In this context, the present work aimed to identify major inhibitory lignocellulosic compounds for yeast fermentation present in five samples of industrial hydrolysates. Glycolic acid and acetic acids were identified in all samples analysed. In relation to furaldehydes, furfural and 5-hydroxymethyl-furfural (HMF) were detected in all samples as well. The major and most abundant phenolic compounds identified were p-coumaric acid (in 4 out of 5 samples), ferulic acid (in 3 out of 5) and vanillic acid (in 3 out of 5). After quantification of these compounds, minimum and maximum concentrations of the major ones were studied in four different laboratory and industrial strains (CEN.PK113-7D, CEN.PK112, SA-1 and JAY270), in order to verify their toxicity against physiological parameters such as elongation of lag phase and growth rate. In general, the *S. cerevisiae* SA-1 industrial strain was more tolerant in comparison to the other 3 strains for virtually all compounds investigated. Since bacteria is present during fuel ethanol production, the resistance of these bacteria for the same inhibitory compounds was also evaluated. When comparing the resistance against inhibitors between lactic acid bacteria and yeast strains, a higher robustness of bacteria in relation to yeasts was observed, since yeasts were unable to grow in a medium supplemented with a cocktail of inhibitors, whereas bacteria did grow.

Finally, the influence of three inhibitory compounds (acetic acid, HMF and p-coumaric acid) on the main physiological parameters of the strain SA-1, the most tolerant among the strains evaluated, was investigated. Thus, using a rotatable central composite design (RCCD), the effects of the three inhibitors were analysed, and it was found that the highest toxicity (reduction in specific growth rate) is caused by HMF. Overall, SA-1 is a promising platform yeast strain for second generation ethanol production and for understanding strain robustness toward lignocellulosic inhibitory compounds.

Keywords: *S. cerevisiae*, lactic acid bacteria, ethanol 2G, lignocellulosic inhibitors, fermentative processes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas de concentração das plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade.....	40
Figura 2 - Estrutura do material lignocelulósico.....	42
Figura 3 - Representação estrutural da celulose.....	43
Figura 4 - Estrutura estereoquímica da hemicelulose.	44
Figura 5 – Estrutura dos monossacarídeos formadores da hemicelulose.....	44
Figura 6 – Representação estrutural dos precursores primários na formação da lignina.....	45
Figura 7 – Representação estrutural da lignina.....	45
Figura 8 - O ciclo de carbono aplicado a bens de consumo e combustíveis.....	46
Figura 9 - Via metabólica clássica da fermentação de glicose a etanol (BAI et al., 2008)	49
Figura 10 - Esquema ilustrativo de produção de etanol 2G.....	51
Figura 11 – Efeito do pré-tratamento na estrutura celular do material lignocelulósico.	52
Figura 12 - Composição média de biomassa lignocelulósica e principais produtos derivados de hidrólise.....	56
Figura 13 - Degradação de glicose5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF).....	58
Figura 14 - Degradação de xilose em 2-furaldeído (furfural).....	58
Figura 15 – Inibidores fenólicos, provenientes da hidrólise da lignocelulose.	59
Figura 16 - Degradação de 2-furaldeído(furfural) em ácido fórmico.....	60
Figura 17 - Degradação de 5-hidroximetil-2-furaldeído em ácido levulínico e fórmico.	61
Figura 18 – Esquema de dissociação do ácido fraco no interior celular.....	62
Figura 19 – Sistemas de cultivo em frasco agitado.....	68
Figura 20 - Taxas específicas de crescimento para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de ácidos orgânicos.....	80
Figura 21 – Duração da fase <i>lag</i> para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de ácidos orgânicos.	80
Figura 22 – Duração da fase <i>lag</i> para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de furaldeídos.	81

Figura 23 - Taxas específicas de crescimento para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de furaldeídos.	82
Figura 24 – Duração da fase <i>lag</i> para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de compostos fenólicos	83
Figura 25 - Taxas específicas de crescimento para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de compostos fenólicos....	83
Figura 26 – Duração da fase <i>lag</i> para diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido <i>p</i> -cumárico em linhagem CEN.PK 113-7D.....	86
Figura 27 – Taxa máxima de crescimento celular para diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido <i>p</i> -cumárico em linhagem CEN.PK 113-7D.....	86
Figura 28 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), célula ($Y_{X/S}$) e glicerol ($Y_{GLI/S}$) para diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido <i>p</i> -cumárico em linhagem CEN.PK 113-7D.....	86
Figura 29 – Curva de crescimento celular na presença de $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido <i>p</i> -cumárico para diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	88
Figura 30 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e célula ($Y_{X/S}$) para $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido <i>p</i> -cumárico.....	88
Figura 31 - Curva de crescimento das bactérias lácticas LAB1(a), LAB2(b), LAB3(c) e LAB4(d).....	90
Figura 32 - Curva de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> , (a) CEN.PK 113-7D e (b) SA-1	91
Figura 33 – Superfície resposta do efeito dos inibidores ácido <i>p</i> -cumárico e HMF na velocidade específica de crescimento máxima.....	97
Figura 34 – Superfície resposta do efeito dos inibidores ácido <i>p</i> -cumárico e ácido acético na velocidade específica de crescimento máxima.....	97
Figura 35 - Superfície resposta do efeito dos inibidores HMF e ácido acético na velocidade específica de crescimento máxima.....	98
Figura 36 – Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes no fator de conversão de substrato a células.	99
Figura 37 - Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes no fator de conversão de substrato a etanol.....	100
Figura 38 - Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes no fator de conversão de substrato a glicerol.	101

Figura 39 - Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes na velocidade específica de conversão de HMF.	102
Figura 40 - Curva de calibração de padrão de ácido acético no detector RID.	124
Figura 41 - Curva de calibração de padrão de ácido levulínico no detector RID.....	124
Figura 42 - Curva de calibração de padrão de HMF no detector RID.	124
Figura 43 - Curva de calibração de padrão de furfural no detector RID.	125
Figura 44 - Curva de calibração de padrão de ácido <i>p</i> -cumárico no detector UV-Vis.	125
Figura 45 - Curva de calibração de padrão de ácido ferrulico no detector UV-Vis. .	125
Figura 46 – Curva de calibração de padrão de ácido vanílico no detector UV-Vis. .	126
Figura 47 – Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 1. ...	127
Figura 48 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 1.	127
Figura 49 - Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 1.	127
Figura 50 - Cromatograma da identificação dos ácidos orânicos na amostra 2	128
Figura 51 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 2.	128
Figura 52 – Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 2.	128
Figura 53 - Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 3	129
Figura 54 – Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 3.	129
Figura 55 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 3.	129
Figura 56 - Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 4. ...	130
Figura 57 – Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 4.	130
Figura 58 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 4.	130
Figura 59 - Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 5. ...	131
Figura 60 - Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 5.	131

Figura 61 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 5.	
.....	131
Figura 62 – Quadro com a identificação e o range das bactérias lácticas estudadas.	
.....	133

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais métodos de pré-tratamento de material lignocelulósico.....	52
Quadro 2 - Vantagens e Desvantagens dos pré-tratamentos em material lignocelulósico.....	53
Quadro 3 – Efeitos negativos provocado às leveduras frente a diferentes tipos de estresse.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Projeção Exportação de açúcar Centro da safra 2018/2018 na posição acumulada entre 1° de abril até 1° de junho de 2018.....	40
Tabela 2 - Composição química dos três principais tipos de biomassa lignocelulósica (% mássica).....	41
Tabela 3 - Balanço de energia na produção de etanol, com diversas matérias-primas.....	48
Tabela 4 – Concentração ($\text{g}\cdot\text{kg}_{\text{DW}}^{-1}$) de compostos furânicos após pré-tratamento de bagaço de cana.....	59
Tabela 5 – Concentração ($\text{g}\cdot\text{kg}_{\text{DW}}^{-1}$) de compostos fenólicos após pré-tratamento de bagaço de cana.....	60
Tabela 6 – Concentração ($\text{g}\cdot\text{kg}_{\text{DW}}^{-1}$) de ácidos orgânicos após tratamento de bagaço de cana.....	61
Tabela 7 - Efeito de diferentes inibidores na fermentação por microrganismos fermentadores de hexose. As percentagens são dadas como resultado na fermentação com composto adicionado em relação à fermentação de referência sem adição de composto.	63
Tabela 8 - Efeito de diferentes inibidores na fermentação por microrganismos fermentadores de pentoses. As percentagens são dadas como resultado na fermentação com composto adicionado em relação à fermentação de referência sem adição de composto	64
Tabela 9 – Linhagens de levedura usadas neste estudo.	65
Tabela 10 - Composição do meio de cultivo definido.	66
Tabela 11 - Níveis de confiança na identificação via MALDI-Biotyper.	72
Tabela 12 – Matriz de ensaios do delineamento composto central rotacional de 2^3 em ordem padrão.	75
Tabela 13 – Identificação e quantificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados industriais de bagaço de cana-de-açúcar.....	78
Tabela 14 – Estudos de identificação e quantificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.	78
Tabela 15 - Concentrações máximas e mínimas testadas em diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	79

Tabela 16 – Fase <i>lag</i> , taxa de crescimento máximo e máxima absorbância para as 4 linhagens.	84
Tabela 17 – Parâmetros fisiológicos na presença de 0,82 g·L ⁻¹ de ácido <i>p</i> -cumárico para diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	88
Tabela 18 - Identificação de microrganismos (bactérias lácticas) via diferentes métodos.	89
Tabela 19 – Dados de crescimento celular para bactérias lácticas.	90
Tabela 20 – Valores reais e níveis dos fatores estudados para o DCCR em configuração estrela.	92
Tabela 21 – Planejamento DCCR com pontos axiais e centrais da avaliação dos inibidores na fermentação por leveduras.	92
Tabela 22 – Efeito das variáveis para os parâmetros fisiológicos.	93
Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de 2ª ordem para os parâmetros fisiológicos.	94
Tabela 24 – Compostos da curva de calibração utilizados para identificação via HPLC.	123
Tabela 25 – Identificação do tempo de retenção dos compostos inibidores em hidrolisados lignocelulósicos.	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Símbolo	Nomenclatura
1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
Abs₆₀₀	Absorbância a 600nm
DNA	DeoxyriboNucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico
DW	Massa seca de células (“dry weighth”)
E	Etanol
GLC	Glicose
GLI	Glicerol
HMF	5-hydroximetil-2-furaldeído
OD	Optical density – Densidade ótica
S	Substrato
X	Células
DCCR	Delineamento composto central rotacional

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Nomenclatura	Unidade
$\mu_{\text{máx.}}$	Velocidade específica máxima de crescimento	h^{-1}
q_{HMF}	Velocidade específica de conversão de HMF	$\frac{\text{mmol}_{\text{HMF}}}{\text{h} \cdot \text{g}_{\text{DW}}}$
q_s	Velocidade específica de consumo de substrato	$\frac{\text{mmol}_{\text{GLC}}}{\text{h} \cdot \text{g}_{\text{DW}}}$
q_p	Velocidade específica de produção de produto	$\frac{\text{mmol}_E}{\text{h} \cdot \text{g}_{\text{DW}}}$
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato a biomassa	$\frac{\text{g}_{\text{DW}}}{\text{g}_{\text{GLC}}}$
$Y_{E/S}$	Fator de conversão de substrato a etanol	$\frac{\text{g}_E}{\text{g}_{\text{GLC}}}$
$Y_{\text{GLI}/S}$	Fator de conversão de substrato a glicerol	$\frac{\text{g}_{\text{GLI}}}{\text{g}_{\text{GLC}}}$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	OBJETIVOS.....	37
3	REVISÃO DA LITERATURA	39
3.1	A CANA-DE-AÇÚCAR E O SEU POTENCIAL NA GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS	39
3.2	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	41
3.2.1	<i>Celulose .....</i>	<i>42</i>
3.2.2	<i>Hemicelulose .....</i>	<i>43</i>
3.2.3	<i>Lignina .....</i>	<i>44</i>
3.2.4	<i>Cinzas e extrativos .....</i>	<i>45</i>
3.3	PRODUÇÃO DE ETANOL	46
3.3.1	<i>Etanol de primeira geração (1G) .....</i>	<i>47</i>
3.3.1.1	<i>Rota metabólica de produção de etanol .....</i>	<i>48</i>
3.3.2	<i>Etanol de segunda geração (2G).....</i>	<i>50</i>
3.4	PROCESSAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	51
3.4.1	<i>Pré-tratamento.....</i>	<i>51</i>
3.4.2	<i>Hidrólise enzimática .....</i>	<i>54</i>
3.4.3	<i>Fermentação por leveduras.....</i>	<i>54</i>
3.5	FORMAÇÃO DE INIBIDORES DURANTE O PROCESSAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	56
3.5.1	<i>Derivados furânicos.....</i>	<i>58</i>
3.5.2	<i>Compostos fenólicos .....</i>	<i>59</i>
3.5.3	<i>Ácidos orgânicos .....</i>	<i>60</i>
3.6	EFEITO DOS INIBIDORES SOBRE LEVEDURAS	61
4	MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1	MICROORGANISMOS	65
4.1.1	<i>Preparo do banco de estoque .....</i>	<i>65</i>
4.2	MEIOS DE CULTIVO	66
4.2.1.1	<i>Meio definido .....</i>	<i>66</i>
4.2.1.2	<i>Meios complexos.....</i>	<i>67</i>
4.2.1.2.1	<i>Meio YPD.....</i>	<i>67</i>

4.2.1.2.2 Meio MRS	67
4.3 HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS.....	67
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	68
4.4.1 Cultivo em frasco agitado.....	68
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	69
4.5.1 Quantificação da concentração celular	69
4.5.2 Quantificação de metabólitos extracelulares e intracelulares	70
4.5.2.1 Ácidos orgânicos	70
4.5.2.2 Derivados furânicos	70
4.5.2.3 Compostos Fenólicos	71
4.5.3 Identificação de microrganismos.....	71
4.5.3.1 Identificação via técnica MALDI Biotyper.....	71
4.5.3.2 Identificação via metodologia 16S	72
4.6 CÁLCULO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	73
4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS INIBITÓRIOS PRESENTES EM HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	77
5.2 AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS EM LINHAGENS DE S. CEREVISIAE LABORATORIAIS E INDUSTRIAIS	78
5.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS DO ÁCIDO P-CUMÁRICO EM LEVEDURAS	85
5.4 ESTUDO COMPARATIVO DO CULTIVO NA PRESENÇA DE INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS ENTRE BACTÉRIAS LÁCTICAS E LEVEDURAS LABORATORIAIS E INDUSTRIAIS	88
5.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	91
5.5.1 Velocidade específica de crescimento máxima	95
5.5.2 Fator de conversão de substrato a célula	98
5.5.3 Fator de conversão de substrato a etanol.....	99
5.5.4 Fator de conversão de substrato a glicerol	100
5.5.5 Velocidade específica de conversão de HMF.....	101
6 CONCLUSÕES	103
Referências bibliográficas	105
APÊNDICE A	123

APÊNDICE B.....	127
APÊNDICE C.....	133

1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol combustível a partir de cana-de-açúcar constitui uma indústria promissora na inevitável transição dos combustíveis fósseis para alternativas sustentáveis. O Brasil é o segundo maior produtor e o primeiro exportador mundial de etanol, tendo, segundo UNICA (2018), produzido na safra 2017/2018 26,089 bilhões de litros de etanol total (anidro + hidratado). Apesar de sutis flutuações no preço do produto final, a indústria sucroalcooleira é responsável pela movimentação de um montante considerável do PIB nacional, assegurando milhões de empregos no país e constituindo um exemplo emblemático da biotecnologia industrial (DELLA BIANCA et al., 2013).

No cenário energético mundial, o Brasil destaca-se por ser considerado um dos países que implantou pioneiramente, em larga escala, um programa de combustível alternativo ao petróleo com muitas vantagens ambientais, econômicas e sociais. O etanol é utilizado como combustível em grande escala no Brasil, Estados Unidos e em alguns países europeus (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). No entanto, para que o etanol produzido no país continue a ser mais competitivo, é de extrema necessidade que se continue a investir no aprimoramento do processo de produção bem como na ampliação das fontes de matéria-prima.

Tanto para produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, por meio da biomassa de composição lignocelulósica, a via fermentativa é a via mais importante para a obtenção do produto no Brasil (SILVA, 2010). Um dos fatores que viabiliza a produção do bioetanol é o grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país (PEREIRA JR. et al., 2008). Sendo, num todo, o combustível que representa mais da metade de todos os combustíveis usados em automóveis no Brasil (KOHLHEPP, 2010).

Atualmente, os rendimentos da etapa de fermentação alcoólica do processo de produção de etanol são elevados e o processo está em estágio tecnológico bastante avançado. No entanto, aumentos sutis no rendimento e/ou na produtividade podem significar grandes aumentos em termos de lucratividade do processo e utilização

eficiente da fonte de carbono (WYMAN e HINMAN, 1990; AMORIM et al., 2011; DELLA BIANCA et al., 2013).

Para solucionar este impasse, destacam-se os materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo fundamental um pré-tratamento para alterar a estrutura da biomassa celulósica a fim de tornar a celulose mais acessível para as enzimas que convertem os polissacarídeos em açúcares fermentáveis (MOSIER et al., 2005). Esta tecnologia contribui para o menor custo de produção do etanol de segunda geração (BOTHAST e SAHA 1997; LIU et al. 2008). Resultados mostraram que o custo de equilíbrio para o etanol lignocelulósico foi ~ US\$ 0,60/litro em que o custo da matéria-prima contribuiu US\$ 0,20/litro, enzima US\$ 0,09/litro e conversão não enzimática US\$ 0,29/litro (HUMBIRD et al., 2011).

Decorrente da etapa de pré-tratamento tem-se a formação de compostos inibitórios ao processo de fermentação via leveduras os quais influenciam negativamente as etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação microbiana (JÖNSSON et al. 2013; KO et al. 2015; RASMUSSEN et al. 2014), limitando a utilização eficiente do hidrolisado para produção de etanol (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL 2000). Os compostos inibidores podem ser divididos em três grupos principais: (a) ácidos fracos, (b) derivados furânicos e (c) compostos fenólicos (ALMEIDA et al. 2007; JÖNSSON et al. 2013; PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL 2000).

Em vista do exposto, o presente trabalho buscou, inicialmente, identificar e quantificar os principais compostos inibidores lignocelulósicos presentes em amostras industriais de hidrolisados, bem como avaliar o efeito tóxico dos principais compostos identificados em linhagens laboratoriais e industriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As bactérias lácticas estão presentes em todas as usinas (DELLA-BIANCA et al., 2013; BASSO et al., 2014), e certamente estarão presentes nos processos de segunda geração, desta forma o estudo dos efeitos que os inibidores provocaram nestes microrganismos é de suma importância para avaliar possíveis competições pela fonte de carbono. Por fim realizou-se um planejamento experimental, a fim de investigar os efeitos de três diferentes inibidores (ácido *p*-

cumárico. HMF e ácido acético) nos parâmetros fisiológicos da fermentação ($\mu_{\text{máx}}$, $Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$, $Y_{GLI/S}$ e q_{HMF}), assim como possíveis efeitos interativos entre os inibidores das diferentes classes.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como foco principal avaliar o processo de produção de etanol a partir de substratos lignocelulósicos oriundos da cana-de-açúcar, através da identificação dos principais inibidores inerentes ao mesmo, e da avaliação de seus efeitos sobre leveduras industriais e de laboratório, bem como sobre potenciais bactérias contaminantes do processo. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram conduzidos:

1. Identificar e quantificar os principais inibidores presentes em amostras industriais de hidrolisados lignocelulósicos (provenientes do bagaço da cana-de-açúcar) que afetam o crescimento e o metabolismo celular da levedura *S. cerevisiae*;
2. Avaliar o efeito no crescimento celular de diferentes inibidores lignocelulósicos em diferentes concentrações sobre leveduras industriais e de laboratório;
3. Comparar a resistência de leveduras laboratoriais e industriais frente aos efeitos inibitórios do ácido *p*-cumárico;
4. Comparar parâmetros fisiológicos entre bactérias lácticas e leveduras laboratoriais e industriais na presença de inibidores lignocelulósicos;
5. Avaliar a combinação de inibidores da fermentação, presentes em hidrolisados lignocelulósicos, sobre a levedura industrial SA-1 por meio de planejamento experimental (DCCR).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A CANA-DE-AÇÚCAR E O SEU POTENCIAL NA GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea da família Poaceae (ROSILLO-CALLE et al., 2005). É composta basicamente de duas partes: uma subcutânea, onde se observam os rizomas e as raízes e, outra aérea, onde se observam o colmo, as folhas e as flores (QUINELATO, 2016).

Estruturalmente, a cana consiste de vários tipos de tecidos, tais como o córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. O córtex é composto de fibras muito lignificadas, sendo caracterizado pela espessura da parede celular, comprimento e rigidez de suas fibras. Este tecido confere proteção contra os efeitos mecânicos externos, servindo de suporte para a planta. A parte interior do talo é constituída por um tecido parenquimatoso (medula) de caráter não fibroso, o qual possui como principal função o armazenamento dos carboidratos produzidos pela planta. Imerso dentro deste tecido, encontram-se as hastes fibrovasculares, compostas de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução dos nutrientes pela planta (PATURAU, 1989).

A monocultura da cana-de-açúcar teve início no Brasil em 1550, logo após sua colonização e estende-se até os dias atuais, porém, o cultivo voltado à bioenergia se intensificou em 1970, quando houve um grande salto no preço do petróleo, passando de US\$ 2,91/barril para US\$ 12,45/barril, um aumento de 428%. Tendo em vista que o país importava mais de 80% do petróleo que consumia (LEITE e LEAL, 2007), tal aumento levou o governo brasileiro a tomar a decisão (BARROS, 2007) de criar o Programa Nacional do Álcool, popularmente conhecido como Proálcool, onde passou, a partir deste, a produzir álcool combustível em larga escala empregando a cana-de-açúcar como matéria-prima. No Brasil o cultivo de cana-de-açúcar concentra-se nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. O mapa abaixo (Figura 1) mostra em vermelho as áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP e do CTC (UNICA, 2016).

Figura 1 - Áreas de concentração das plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade.

O Brasil é hoje o segundo maior produtor mundial de cana-de-açúcar e o maior exportador de etanol, apresentando menores custos de produção, decorrente do clima propício para o cultivo da planta, diferentemente dos países localizados em regiões equatoriais úmidas (MORO, 2015 e NYKO et al., 2010).

A estimativa da safra de 2018/2019 segundo a UNICA (2018) pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 - Projeção Exportação de açúcar Centro da safra 2018/2018 na posição acumulada entre 1º de abril até 1º de junho de 2018.

Produto	Centro-Sul		
	2017/2018	2018/2019	Variação (%)
Cana-de-açúcar ¹	112209	134839	↑20,17%
Açúcar ¹	5714	5490	↓-3,93%
Etanol anidro ²	1693	1787	↑5,54%
Etanol hidratado ²	2623	4768	↑81,79%
Etanol total ²	4316	6555	↑51,88%
ATR ¹	13280	16681	↑25,61%
ATR/tonelada de cana ³	118,35	123,71	↑4,53%
Litros etanol/ tonelada de cana	38,06	47,75	↑25,44%
Kg açúcar/ tonelada de cana	50,93	40,71	↓-20,05%

Fonte: Adaptado de União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA), 2018. Nota: ¹: mil toneladas, ²: milhões de litros, ³ kg de ATR/tonelada de cana. Para efeito e cálculo do “ATR produto”, excluiu-se a produção realizada em etanol a partir de milho.

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Designam-se por materiais lignocelulósicos os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem constituídos principalmente por polissacarídeos, celulose e hemicelulose, e de lignina (SALANTINI et al., 2010), além de outros compostos em pequenas quantidades.

O bagaço é um subproduto da indústria sucroalcooleira, gerado após a passagem da cana-de-açúcar pelas moendas para a retirada do caldo, o qual sofrerá diferentes transformações de acordo com o destino final. Segundo a União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA, 2012), uma tonelada de cana produz em média 280 Kg de bagaço e 234 Kg de palha e pontas, podendo ser utilizado na geração de energia elétrica a partir da sua queima nas caldeiras da usina ou então ser matéria-prima para a produção de etanol 2G. Apesar de ser um resíduo da usina de produção de etanol de primeira geração, este bagaço ainda possui altas concentrações de açúcares a qual pode ser utilizada na produção de etanol via rota de segunda geração, após passar por uma etapa de pré-tratamento para alterar a estrutura da biomassa celulósica a fim de tornar a celulose mais acessível para as enzimas que convertem os polissacarídeos em açúcares fermentáveis (MOSIER et al., 2005).

Na Tabela 2, pode-se ver a composição da biomassa proveniente da cana-de-açúcar, segundo Milanez (2015) e na Figura 2 apresenta-se de forma simplificada a estrutura molecular destes constituintes.

Tabela 2 - Composição química dos três principais tipos de biomassa lignocelulósica (% mássica).

Componente	Biomassa ^a		
	Colmos de cana-de-açúcar	Palha de cana-de-açúcar ^b	Cana-energia ^c
Celulose	6,0	32,4	10,0
Hemicelulose	3,5	24,8	5,9
Lignina	3,2	20,6	5,4
Outros	2,4	2,6	1,3

^a Não inclui as impurezas minerais.

^b Composição para a palha enfardada. A umidade da palha integral varia conforme a quantidade recolhida: 33,6 % para 50% de recolhimento; 31,3% para 60% de recolhimento; e 29,6% para 70% de recolhimento.

^c Considerada composição integral (colmo + palha)

Figura 2 - Estrutura do material lignocelulósico.

Fonte: RUBIN, 2008.

3.2.1 CELULOSE

A celulose é a base estrutural da célula das plantas, de 32-50% em massa (em base seca) compõe o material lignocelulósico. É um homopolímero linear de glicose composto por unidades de anidro-glicose unidas por ligações glicosídeas do tipo β -1,4-glicosídeo (JÖNSSON e MARTÍN, 2016), cuja unidade de repetição é a celobiose, com fórmula geral ($C_{12}H_{22}O_{11}$) e fórmula estrutural observada na Figura 3

A celulose é passível de hidrólise enzimática, resultando na produção final de glicose, a qual pode ser fermentada (BRASIL, 2008).

Figura 3 - Representação estrutural da celulose.

Fonte: TIMAR-BALAZSY e EASTOP, 1998.

3.2.2 HEMICELULOSE

A hemicelulose (Figura 4) está presente em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentra-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, as quais estão intimamente associadas à celulose e à lignina. Segundo Jönsson e Martín (2016), o material lignocelulósico é composto por 19-25% deste componente em massa (base seca).

É um heteropolímero constituído por pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose e α -D-galactose), ácido glucurônico e ácido manurônico (SARKAR et. al., 2012; OGEDA et. al. 2010; BRODEUR et.al., 2011). Confere às fibras rigidez, pois atua realizando ligações entre a lignina e as fibras de celulose. As estruturas dos principais açúcares constituintes da hemicelulose são vistos Figura 5.

Figura 4 - Estrutura estereoquímica da hemicelulose.

Fonte: GLASSER e KELLY, 1987.

Legenda: Ac: grupo acetila; α -Araf: α - Arabinofuranose; α -4-o-Me-GlcA: α -4-o-ácido metilglucurônico.

Figura 5 – Estrutura dos monossacarídeos formadores da hemicelulose.

Fonte: MORAIS et al., 2005; RODRIGUES e CAMARGO (2008).

3.2.3 LIGNINA

A lignina é um heteropolímero derivado de moléculas fenólicas e formado por três constituintes básicos (Figura 6), os alcoóis *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, conectadas a um esqueleto básico de quatro ou mais unidades de fenilpropano (Figura 7) (BOERJAN et al., 2003; HENDRISK E ZEEMAN, 2009). Segundo Jönsson e Martín (2016) sua composição no material lignocelulósico é de 23-32% em massa (base seca).

Figura 6 – Representação estrutural dos precursores primários na formação da lignina.

Legenda: a. Álcool trans-*p*-cumárico b. Álcool trans-coniferílico c. Álcool trans-sinapílico.
Fonte: FENGEL e WEGENER, 1989.

Figura 7 – Representação estrutural da lignina.

Fonte: ROSA E GARCIA, 2009.

3.2.4 CINZAS E EXTRATIVOS

As cinzas e os extrativos localizam-se próximos da parede celular da biomassa lignocelulósica e são compostas por inúmeras substâncias solúveis em solventes neutros ou frações extraíveis que correspondem de 4-10% do peso seco. Incluem uma diversidade de compostos como os terpenos, que são polímeros de isopreno; as resinas, que incluem grande variedade de compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, alcoóis, resinas ácidas, fitoesterol, dentre outros; e os fenóis, que apresentam como representante principal os taninos. Dentro desta fração de extraíveis podem-se incluir carboidratos de baixo peso molecular, alcalóides e lignina solúvel (KLINKE et al., 2004). A interação entre a lignina, celulose e

hemicelulose determinam a ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos (RABELO, 2010).

3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

As alterações climáticas atribuídas ao aquecimento global decorrente da queima dos combustíveis fósseis, associada à insegurança energética refletida pelas dificuldades crescentes na produção do petróleo, têm motivado uma corrida sem precedentes pela produção de energia a partir de fontes renováveis (NYKO et al., 2010). Na Figura 8 é possível observar que a partir de diferentes fontes é possível manter-se o ciclo do carbono aplicado a bens de consumo e combustíveis. Na Figura 8a, apresenta-se um esquema da utilização de recursos fósseis, as quais levam eras para a sua formação e o qual a humanidade está esgotando as reservas. Já na Figura 8b, o carbono utilizado é proveniente de biomassa vegetal, ignorando a necessidade de recursos fósseis, equilibrando o consumo de matéria-prima e também a fixação de dióxido de carbono.

Fonte: Adaptado de VAN MARIS et al., 2006.

A crescente utilização de matérias-primas, como cana-de-açúcar e milho, para a produção de etanol, gera em grandes quantidades, resíduos que ainda são ricos em açúcares e que por sua vez podem ser utilizados como fonte de matéria-prima para a chamada produção de segunda geração. Este tipo de produção não compete com a fração alimentar e nem mesmo por terras férteis, uma vez que o alimento já foi extraído. No entanto, o desenvolvimento de novas técnicas capazes

de empregar o excedente de resíduos lignocelulósicos, em especial, oriundos da cana-de-açúcar, para produção de biocombustíveis, faz-se necessário (BNDES, 2008), a fim de tornar esta técnica mais vantajosa e economicamente viável.

3.3.1 ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO (1G)

O processo de fabricação de etanol no Brasil sofreu poucas modificações desde o seu início. Até os anos 60, era comum utilizar nos processos descontínuos ou em batelada. Após este período, o processo foi substituído gradativamente pelo processo de *Melle-Boinot*, que é realizado em batelada alimentada com reciclo de células. Neste processo, após o fim da fermentação, 90-95% das células de levedura são coletadas por centrifugação e reutilizadas em um próximo ciclo de fermentação, resultando em altas densidades celulares dentro do fermentador (10 a 14% (base de peso molhado/v)). A reutilização das células reduz a necessidade de propagação intensiva de fermento, e menos açúcar é desviado para a formação de biomassa. Estima-se que a biomassa de levedura aumenta de 5 a 10% (em relação à biomassa inicial) durante um ciclo de fermentação, o que é suficiente para substituir as células de levedura perdidas durante o passo de centrifugação. Esta alta concentração de biomassa de levedura elevada dentro do fermentador é responsável por um tempo de fermentação muito curto de 6 a 10 h, quando comparado a 40 a 50 h no processo de fermentação do milho. Normalmente, a temperatura é mantida em torno de 32 a 35°C, no entanto, devido ao tempo de fermentação curto, o resfriamento nem sempre é suficientemente eficiente na remoção de calor e a temperatura pode atingir até 40°C, especialmente na estação do verão (LALUCE, 1991; WHEALS et al., 1999; AMORIM et al., 2004)

A aplicação deste método melhorou a eficiência do processo fermentativo, já que com menor quantidade de açúcar passou-se a produzir maior volume de etanol, ou seja, houve um aumento no rendimento da fermentação. Entre vantagens e desvantagens, o processo de *Melle-Boinot* continua sendo o mais utilizado nas destilarias e grandes usinas sucroalcooleiras brasileiras.

A produção de etanol no Brasil tem aumentado nos últimos anos e tornando-se uma indústria promissora na inevitável transição dos combustíveis fósseis para alternativas sustentáveis. Para os países industrializados comprometidos com as metas do Protocolo de Kyoto, o uso de biocombustíveis representa uma das formas mais efetivas de reduzir as emissões líquidas de gases de efeito estufa associadas ao consumo energético no setor de transporte (MACEDO, 2007). No entanto, o desenvolvimento nos últimos anos de técnicas que utilizem fontes mais limpas mostra claramente uma grande diferença na capacidade de redução de emissões entre os diversos biocombustíveis, indicando grande vantagem para o etanol de cana produzido no Brasil (MACEDO, 2006), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Balanço de energia na produção de etanol, com diversas matérias-primas.

Matéria – prima	País pioneiro da tecnologia	Energia renovável
		Energia fóssil
Etanol de cana de açúcar	Brasil	8,9
Etanol de milho	Estados Unidos da América	1,3
Etanol de beterraba	Alemanha	2,0
Etanol de sorgo sacarino	África	4,0
Etanol de trigo	Europa	2,0
Etanol de Mandioca	-	1,0

3.3.1.1 Rota metabólica de produção de etanol

A via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) (Figura 9) é a principal via metabólica envolvida na produção do etanol por leveduras. As leveduras são capazes de converter açúcares (glicose, principalmente) em etanol e dióxido de carbono, bem como outros importantes metabólitos, como glicerol, ácido acético, ácido succínico, piruvato, alcoóis superiores e seus ésteres. Esta via consiste de uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de hexose ($C_6H_{12}O_6$) metabolizada duas moléculas de piruvato ($C_3H_4O_3$) são produzidas no citoplasma da célula (BAI et al., 2008) (Equação 1). Em sequência a partir da descarboxilação do piruvato gera como produto CO_2 e acetaldeído (Equação 2), o qual será reduzido a etanol pelo NADH (Equação 3) em uma reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase.

Figura 9 - Via metabólica clássica da fermentação de glicose a etanol (BAI et al., 2008)

Legenda: HK: enzima hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bifosfatoaldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfogliceratoquinase, PGM: fosfoglicomutase, ENO: enolase, Pyk: piruvatoquinase, PDC: piruvato descarboxilase, e ADH: álcool desidrogenase.

3.3.2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

O Brasil é considerado um país com grandes potencialidades para desenvolver o chamado etanol de segunda geração (E2G), o qual utiliza como matéria-prima a biomassa lignocelulósica residuária da produção de etanol convencional (1G), tais como bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, entre outros. Os esquemas de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica são referidos como uma segunda geração de biocombustíveis, cujo processamento é uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento (BASTOS, 2007).

Esta promissora tecnologia, gera possível economias, tornando sua produção amplamente estudada, uma vez que aumenta a produtividade (em aproximadamente 50%) de etanol por hectare de cana-de-açúcar plantada de forma a atender a crescente demanda por biocombustível, aproveita a cana de açúcar e seus subprodutos utilizando insumos já disponíveis nas unidades, além de questões ambientais reduzindo a emissão de carbono durante a produção garantindo desta forma um combustível mais limpo e uma produção garantida durante as entressafras da cana (LIMA, 2011; RAÍZEN, 2017).

O bagaço da cana-de-açúcar, material lignocelulósico, é matéria prima de baixo custo (R\$ 30–20,00/tonelada) e já disponível nas destilarias, necessitando apenas de uma etapa de pré-tratamento e hidrólise, a fim de tornar possível a metabolização dos açúcares poliméricos presentes na biomassa (fermentação). O pré-tratamento afasta as barreiras físicas e químicas que fazem a biomassa recalcitrante tornando a celulose passível de hidrólise enzimática. Este efeito é alcançado pelo aumento da área superficial acessível através da solubilização de hemicelulose e/ou lignina, compostos que revestem a biomassa (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Na Figura 10, pode-se observar um esquema ilustrativo da produção de etanol 2G.

3.4 PROCESSAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

3.4.1 PRÉ-TRATAMENTO

Os materiais lignocelulósicos, devido à sua estrutura recalcitrante, são uma grande barreira para o fracionamento dos componentes dessa biomassa (QUINELATO, 2016). Portanto, torna-se necessário realizar um pré-tratamento desses materiais de modo a aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos (RABELO, 2010). A Figura 11, mostra de forma ilustrativa o efeito do pré-tratamento na estrutura do material lignocelulósico.

Figura 11 – Efeito do pré-tratamento na estrutura celular do material lignocelulósico.

Fonte: Adaptado de HSU et al., 1980.

De acordo com o tipo de material lignocelulósico e a finalidade que terá, os pré-tratamentos variam em métodos físicos, químicos e/ou biológicos (Quadro 1), assim como suas combinações e devem, segundo Sun e Cheng (2002), atender às seguintes exigências: (1) melhorar a formação de monossacarídeos durante a hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação ou perda de carboidratos; (3) evitar a formação de inibidores para os processos subsequentes de hidrólise e fermentação; e (4) ser viável economicamente. Cada tipo de pré-tratamento possui vantagens e desvantagens (Quadro 2), devendo ser levada em consideração de acordo com a matriz celulósica utilizada.

Quadro 1 - Principais métodos de pré-tratamento de material lignocelulósico.

Métodos Físicos	Métodos Químicos	Métodos Biológicos	Métodos Combinados
Vapor	Ozonólise	Pré-tratamento por fungos	Explosão á vapor
Radiação	Hidrólise com ácido diluído	Pré-tratamento Bioorganossolv	Hidrotérmico
Moinho de bola	Hidrólise com ácido concentrado		SO ₂ e vapor
Moinho do tipo martelo	Ácido acético		NO ₂ e irradiação
Barra Giratória	Hidrólise alcalina		Alcalino e moinho de bolas
Umidificação	Amônia		AFEX
Água quente	SO ₂		Explosão com CO ₂
Pirólise	Designificação oxidativa		
	Processo Organossolv		

Fonte: Adaptado de SANDDLER et al., 1993 e SANCHEZ e CARDONA, 2008.

Quadro 2 - Vantagens e Desvantagens dos pré-tratamentos em material lignocelulósico

Pré-tratamento	Vantagem	Desvantagem
Alcalino	Eficiente remoção da lignina	Alto custo de catalisadores alcalinos
Ácido	Baixa formação de inibidores.	Alteração na estrutura da lignina.
	Rendimento elevado no teor de glicose.	Alto custo dos ácidos e precisa ser recuperado.
	Solubiliza hemiceluloses.	Alto custo de equipamentos resistentes à corrosão.
Solventes orgânicos	Hidrolise da lignina e hemicelulose	Formação de inibidores.
	Habilidade para dissolver cargas elevadas de diferentes biomassas.	Alto custo dos solventes.
	Condições suaves de processo (baixa temperatura).	Necessita de recuperação e reciclagem do solvente.
Explosão á Vapor	Custo efetivo.	Degradação parcial da hemicelulose.
	Transformação da lignina e solubilização da hemicelulose em lignina.	Necessária catalise ácida para que o processo seja eficiente em biomassa rica.
	Rendimento elevado no teor de glicose e hemicelulose em duas etapas do processo.	Geração de produtos tóxicos.
Hidrotérmico	Separação de hemicelulose quase pura da matéria-prima.	Alta energia/entrada de água.
	Não precisa de catalisador.	Resíduo sólido necessita ser tratado (celulose/lignina).
	Hidrolise da hemicelulose.	
AFEX	Mais efetivo em biomassa com baixo teor de lignina.	Necessária reciclagem da amônia.
	Celulose fica mais acessível.	Diminui a eficiência com o aumento do teor de lignina.
	Causa inatividade entre lignina e enzimas.	Altera a estrutura da lignina.
	Baixa formação de inibidores.	
Amônia aquosa	Remove a maior parte da lignina.	Alto custo de energia e carga líquida.
	Alta concentração de celulose após pré-tratamento.	
	Materiais herbáceos são bastante afetados.	
Fluido supercrítico	Baixa degradação de açúcares	Requer pressão elevada.
	Custo efetivo	Lignina/hemicelulose não são afetadas.
	Aumento da área	

Fonte: Adaptado: BRODEUR, 2011.

Nos processos atuais, o pré-tratamento com ácido ou explosão a vapor têm recebido um maior foco industrial em relação aos demais tipos, devido aos altos rendimentos de conversão (CARDONA et al., 2010) e às relativas facilidades de implantação, eficiência energética, rapidez e viabilidade econômica (LEIBBRANDT et al., 2011, OLIVÉRIO et al., 2005). O pré-tratamento eficiente é de

suma importância na produção de etanol 2G, visto que é a etapa mais relevante, uma vez que interfere nas etapas subsequentes como a hidrólise enzimática e a formação de inibidores (GOMÉZ RUEDA, 2010), tendo como objetivo principal a obtenção de uma maior produtividade de conversão em açúcares fermentescíveis, de forma que a perda seja minimizada (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

3.4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo de hidrólise enzimática objetiva quebrar os polímeros celulose e hemicelulose, e converte-los em monossacarídeos fermentescíveis, por meio da ação de enzimas (BARROS e JARDINE, 2016). Na Equação (4), é apresentada a estequiometria da hidrólise da celulose.

Normalmente, a etapa de hidrólise ocorre sob condições brandas de pressão, temperatura e pH. Tais condições reduzem a chance de formação de furfurais, os quais dificultam os processos subsequentes. O consórcio enzimático utilizado na hidrólise da celulose e da hemicelulose é genericamente denominado de “enzimas celulósicas”, as quais, segundo Lynd et al.,(2002) e Henrissat (1991) se dividem em três grupos de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico:

- a) Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica;
- b) Exoglucanases, que atuam na região externa da celulose;
- c) β -glucosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose.

3.4.3 FERMENTAÇÃO POR LEVEDURAS

O processo de fermentação alcoólica consiste em uma série de reações químicas catalisadas por um microrganismo, ocorrendo em condições de anaerobiose como meio de provisão de energia para manutenção das atividades vitais e crescimento da levedura. Os principais microrganismos utilizados na

produção industrial de etanol por meio de processos biológico utilizam principalmente as leveduras para a conversão do substrato em produto e alguns gêneros de bactérias. Dentre as mais utilizadas, estão as leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Kluyveromyces fragilis* e *Candida sp.* e também algumas bactérias, como as do gênero *Zymomonas* e bactérias lácticas (SHULER e KARGI, 2002).

No mundo, cerca de 95% da produção de etanol combustível é realizada pela fermentação de determinados açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2011), seu emprego é justificado por seu considerável desempenho na conversão de glicose a etanol, na produtividade e na tolerância alcoólica, desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados. Este comportamento foi adquirido nas intensivas utilizações dessa levedura na fermentação industrial, possibilitando o processo de seleção natural (SHI e JEFFRIES, 1998; GALBE e ZACCHI, 2002; ROSSELL, et al., 2006).

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos tem sido estudada com grande interesse nos últimos anos. Duas opções para o processo de fermentação do hidrolisado lignocelulósico podem ser consideradas. A primeira alternativa, conhecida por hidrólise separada da fermentação (SHF) considera a fermentação realizada após o término da etapa de hidrólise, permitindo que o processo de produção de álcool a partir do material lignocelulósico seja acoplado completamente à planta convencional, com o hidrolisado sendo misturado ao caldo de cana ou ao melaço alimentado à dorna de fermentação. Uma segunda alternativa para a conversão de celulose a etanol é a realização do processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), ocorrendo em um único reator, e levando teoricamente, a maiores velocidades, maiores rendimentos e concentrações mais elevadas de produto, principalmente devido à redução do efeito de inibidores no processo. Quando há fermentação das pentoses e da glicose no mesmo reator o processo é denominado por sacarificação e cofermentação simultâneos (SSCF). E finalmente, o bioprocessos consolidado (CBP) que representa o máximo de integração, na qual todas as operações de caráter biológico, inclusive a produção de enzimas, são realizadas em um único reator (HAMELINCK et al., 2005; RABELO, 2010; PROCÓPIO, 2017).

3.5 FORMAÇÃO DE INIBIDORES DURANTE O PROCESSAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Na hidrólise de materiais lignocelulósicos, seja ela ácida ou feita pela ação de enzimas, alguns componentes com efeito inibidor na fermentação são gerados ou liberados. (ZAUTSEN, 2011).

Variáveis de processo tais como temperatura, tempo, pressão, pH, presença de catalisadores, entre outros, determinam o perfil dos inibidores durante a fermentação (KLINKE et al. 2004; VAN MARIS et al., 2006; CASPETA e NIELSEN, 2015).

Os compostos inibitórios são convencionalmente divididos em três classes (LARSSON et al., 1999, OLIVA et al., 2003 e 2004, KLINKE et al., 2002 e 2004): furanos (produtos de degradação de açúcares), compostos fenólicos e ácidos orgânicos (Figura 12). Suas concentrações podem variar de acordo com o tipo de matéria-prima e as condições de processo empregadas.

Figura 12 - Composição média de biomassa lignocelulósica e principais produtos derivados de hidrólise.

Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2007.

Legenda: HMF = Hidroximetilfurfural

Para que a produção de biocombustíveis atinja maturidade econômica, é imprescindível que a conversão dos açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósicos alcance altos rendimentos e altas produtividades (SKERKER et al., 2013). No entanto, tem sido extensivamente reportado que os inibidores presentes nestes hidrolisados são responsáveis, entre outros efeitos, por inibirem o crescimento celular e a produtividade da etapa de fermentação (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL 2000; KLINKE et al., 2004), entre outros pontos negativos como mostrado na Quadro 3.

Quadro 3 – Efeitos negativos provocado às leveduras frente a diferentes tipos de estresse.

Estresse	Efeito negativo	Referência
Exposição a compostos tóxicos	Alterações na cromatina e no DNA e redução na atividade de tradução; Inativação enzimática Redução na concentração intracelular de NADPH; Efeitos negativos na triagem de sinalização de funções Formação de espécies de oxigênio reativa; Baixos rendimentos de biomassa	ALLEN et al.(2010), ASK et al.(2013a) ASK et al.(2013a) KEWELOH et al.(1990)
Exposição a ácidos orgânicos	Redução nos rendimentos de biomassa Queda nos níveis de ATP intracelular, concomitante ao aumento de energia de manutenção Queda do pH intracelular; Redução na atividade enzimática	VIEGAS e SÁ-CORREIA (1991) HOLYOAK et al.(1996) PAMPULHA e LOUREIRO-DIAS (1990)
Exposição a etanol	Comprometimento da permeabilidade da parede celular Perturbação de triagem e de funções de sinalização, com um incremento do tamanho da célula Indução de mutantes mitocondriais Redução do metabolismo celular Insuficiência de resistência a ácidos.	KUBOTA et al.(2004) JONES e GRENFIELD (1987) IBEAS e JIMENEZ (1997) PAMPULHA e LOUREIRO-DIAS (1989)
Osmótico	Alto acúmulo de glicerol Acúmulo de etanol; Perturbação do cito esqueleto de actina; Redução de viabilidade celular	HOHMANN (2002) D'AMORE et al. (1988) CHOWDHURY et al. (1992)
Físico-químico (temperatura e pH)	Aumento de efeitos prejudiciais de compostos tóxicos Modificação da função da proteína estrutural Redução da atividade celular	PIPER (1993), KÜLTZ (2005)

3.5.1 DERIVADOS FURÂNICOS

A formação dos furanos é exacerbada sob condições de pré-tratamento ácido (TAHERZADEH et al.1997). Estes compostos são gerados pela desidratação de hexoses e pentoses, formando 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) (Figura 13) e 2-furaldeído (Figura 14), respectivamente (ALMEIDA et al., 2007).

A concentração destes compostos varia de acordo com o tipo de material lignocelulósico e o tipo de pré-tratamento utilizados, como pode se observar na Tabela 4. Sua presença em hidrolisados induzem alterações da cromatina, danos no DNA, e inativação de diferentes enzimas glicolíticas.

Figura 13 - Degradação de glicose em 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF).

Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2009.

Figura 14 - Degradação de xilose em 2-furaldeído (furfural).

Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2009.

Tabela 4 – Concentração ($\text{g} \cdot \text{kg}_{\text{DW}}^{-1}$) de compostos furânicos após pré-tratamento de bagaço de cana

	Pré-tratamento							
	Ácido			Auto-hidrolise			Alcalino	
	Fração Líquida	Fração Sólida	Fração Sólida lavada	Fração Líquida	Fração Sólida	Fração Sólida lavada	Fração Líquida	Fração Sólida lavada
Furfural	7,73	4,33	0,18	18,87	2,79	0,09	0,07	0,00
HMF	0,98	1,30	0,00	2,61	1,41	0,00	0,00	0,17
Ác.furânico	0,05	0,06	1,90	0,22	0,13	1,63	0,02	0,02

Fonte: Van der Pol et al., 2015.

3.5.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Em relação aos compostos fenólicos, estes são formados pela solubilização da lignina e através de clivagem oxidativa ou hidrolítica da mesma. Os principais são: 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, álcool dihidroconiferílico, aldeído coniferílico, siringaldeído, e ácido siríngico (SUN et al., 1996), como visto na Figura 15.

Figura 15 – Inibidores fenólicos, provenientes da hidrólise da lignocelulose.

Fonte: Adaptado de LIU, 2011.

Na Tabela 5, verifica-se a concentração destes compostos de acordo com pré-tratamento empregado e a fração utilizada na análise.

Tabela 5 – Concentração ($\text{g} \cdot \text{kg}_{\text{DW}}^{-1}$) de compostos fenólicos após pré-tratamento de bagaço de cana

	Pré-tratamento							
	Ácido			Auto-hidrólise			Alcalino	
	Fração Líquida	Fração Sólida	Fração Sólida lavada	Fração Líquida	Fração Sólida	Fração Sólida lavada	Fração Líquida	Fração Sólida lavada
Ác. <i>p</i> -cumárico	1,579	1,059	0,051	0,810	0,490	0,069	2,108	0,022
Ác. ferulico	0,189	0,152	0,024	0,107	0,067	0,018	0,106	0,005
4-hidroxibenzaldeído	0,203	0,157	0,010	0,322	0,115	0,011	0,479	0,006
Vanilina	0,386	0,135	0,020	0,212	0,088	0,015	0,094	0,002
4-hidroxiacetofenona	0,038	0,019	0,001	0,034	0,020	0,007	0,062	0,016
Isovanilina	0,011	0,003	0,002	0,009	0,001	0,000	0,017	0,004
Acetovanilina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,052	0,012
Acetoserigone	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,269	0,057
4-HB	0,100	0,045	0,000	0,054	0,036	0,012	0,050	0,113
Ác. siríngico	0,063	0,074	0,160	0,065	0,054	0,123	0,096	0,060
Siringaldeído	0,183	0,147	0,052	0,147	0,114	0,048	0,035	0,014

Fonte: Van der Pol et al., 2015.

3.5.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS

A formação dos ácidos orgânicos deve-se à composição de praticamente todos os materiais lignocelulósicos (oriundos da hemicelulose), assim como a degradação de determinados açúcares e dos próprios inibidores.

A degradação dos inibidores 5-hidroximetil-2-furaldeído e do 2-furaldeído leva a formação do ácido fórmico (Figura 16 e Figura 17), e ácido levulínico (Figura 18) (RABELO, 2007). Na Tabela 6, pode-se verificar a concentração destes compostos de acordo com pré-tratamento empregado e a fração utilizada na análise.

Figura 16 - Degradação de 2-furaldeído(furfural) em ácido fórmico.

Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2009.

Figura 17 - Degradação de 5-hidroximetil-2-furaldeído em ácido levulínico e fórmico.

Fonte: Adaptado de ALMEIDA et al., 2009.

Tabela 6 – Concentração ($\text{g} \cdot \text{kg}_{\text{DW}}^{-1}$) de ácidos orgânicos após tratamento de bagaço de cana

Ácido	Pré-tratamento							
	Ácido			Auto-hidrólise			Alcalino	
	Fração Líquida	Fração Sólida	Fração Sólida lavada	Fração Líquida	Fração Sólida	Fração Sólida lavada	Fração Líquida	Fração Sólida lavada
Ác. acético	13,93	10,17	3,01	20,17	13,98	3,57	33,01	7,12
Ác.glutárico	0,52	0,60	0,15	0,30	0,38	0,13	0,11	0,79
Ác. glicólico	4,54	8,28	6,47	12,42	9,94	8,39	7,53	7,31
Ác.levulínico	8,37	13,02	0,69	38,82	18,24	1,16	4,97	1,65
Ác. oxálico	0,75	0,29	0,13	0,66	0,28	0,16	1,27	0,24
Ác. fórmico	1,22	2,08	0,21	3,08	1,69	0,11	7,12	0,19

Fonte: Van der Pol et al., 2015.

3.6 EFEITO DOS INIBIDORES SOBRE LEVEDURAS

Os inibidores gerados no processo de pré-tratamento são fatores limitantes na viabilidade de conversão do material lignocelulósico em etanol, comprometendo a rentabilidade final do processo (HAHN-HAGERDAL et al., 2006; KLINKE et al., 2004; TENGBORG et al., 1998; MARTIN et al., 2003)

Os ácidos fracos, quando não dissociados, são lipossolúveis e podem se difundir através da membrana celular e se ionizar no meio intracelular neutro (Figura 19). Como a proporção de ácido não dissociado e dissociado é regulada pelo pH do meio, os meios mais ácidos tendem a ser mais inibitórios. Pequenas concentrações de ácidos têm um efeito estimulante sobre a produção de etanol, aumentando o requerimento de energia livre das células para manter o pH intracelular em torno da neutralidade, mas em quantidades maiores inibe o crescimento celular (VAN MARIS et al., 2006), pois aumenta o pH intracelular, diminuindo o pH citoplasmático. Dois mecanismos foram propostos para explicar o efeito inibitório do ácido acético nas células. Um deles é a teoria do desacoplamento, a qual sugere

que a diminuição do pH intracelular causada pela difusão da forma não dissociada do ácido, deve ser compensada pelo bombeamento de prótons para fora da células pela enzima ATPase de membrana. Quando a concentração do ácido é alta superando a capacidade de bombeamento de prótons, acidificação do citoplasma e posterior morte celular ocorrem. Outro mecanismo proposto para explicar o efeito inibitório do ácido acético é o acúmulo intracelular de ânions. Esta teoria relaciona a inibição com a toxicidade dos ânions. Enquanto os prótons são excretados ao exterior da célula, os ânions são capturados pela mesma e se acumulam no interior da célula (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Figura 18 – Esquema de dissociação do ácido fraco no interior celular.

Fonte: ZEFERINO, 2013.

Os furanos, por exemplo, em baixas concentrações podem ter um efeito positivo no crescimento celular, porém em altas concentrações inibem o crescimento celular e o rendimento de fermentação, esta inibição é devida à interferência com as enzimas metabólicas e a geração de prolongadas fases de latências (KLINKE et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007). Algumas linhagens de leveduras podem ser mais sensíveis aos efeitos inibitórios do furfural do que ao HMF, ambos nas mesmas concentrações (LIU et al., 2004). Durante a fermentação a levedura reduz os furanos aos respectivos alcoóis (furfurílico e 5-hidroximetil furfurílico) (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b), de toxicidade menor (OLIVA et al., 2003). O furfural também é capaz de inibir as enzimas glicolíticas, enquanto o HMF é menos tóxico do que o primeiro, e suas concentrações em hidrolisados geralmente são baixas.

Os compostos fenólicos afetam a integridade das membranas biológicas devido à sua lipofilicidade, afetando a capacidade dessas membranas de atuar como barreiras seletivas. De uma forma geral, quanto menor a massa molar, mais tóxico é o composto (KLINKE et al., 2004). O efeito inibitório dos compostos fenólicos é uma função da combinação de grupos laterais funcionais (tais como grupos metoxi) e a presença de ligações insaturadas na estrutura do composto (ADEBOYE et al., 2014). Ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico ambos são caracterizados por terem dois átomos de carbono compartilhando uma ligação dupla e ligando os grupo carboxílico ao anel aromático. Eles diferem apenas na presença de um grupo metoxi presente no anel aromático, no caso do ácido ferúlico.

As Tabela 7 e 8, apresentam os efeitos de alguns inibidores na taxa máxima de crescimento e nos coeficientes de rendimento no crescimento celular de microrganismos fermentadores de hexoses e pentoses, respectivamente.

Tabela 7 - Efeito de diferentes inibidores na fermentação por microrganismos fermentadores de hexose. As percentagens são dadas como resultado na fermentação com composto adicionado em relação à fermentação de referência sem adição de composto.

Composto	Conc (mM)	Crescimento (%)	q_{Etanol} (%)	Y_{Etanol} (%)	Microrganismo	Referência
Ac. Vanílico	6	ND	96	98	<i>S. cerevisiae</i> Hakken n°1	Ando et al., 1986
	10	ND	87	102	<i>S. cerevisiae</i> ATTC 96581	Klinke et al., 2003
	22	ND	50	ND	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Clarck e Mackie, 1984
Ac. ferúlico	64	ND	ND	50	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Lee et al., 1999
	1	92	45	102	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Larsson et al., 2000
	5	39	20	100	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Larsson et al., 2000
Furfural	10	19	ND	20	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	Delgenes et al., 1996
	10	81	ND	82	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	Delgenes et al., 1996
	21	11	ND	10	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	Delgenes et al., 1996
	21	ND	ND	86	<i>S. cerevisiae</i> ATTC 96581	Palmqvist et al., 1999
	21	ND	ND	82	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Palmqvist et al., 1999
	21	44	ND	56	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	Delgenes et al., 1996
	21	ND	ND	131	<i>C. shehatae</i> NJ23	Palmqvist et al., 1999
HMF	65	ND	ND	50	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Lee et al., 1999
	8	29	ND	35	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	Delgenes et al., 1996
	24	17	ND	17	<i>S. cerevisiae</i> CBS 1200	Delgenes et al., 1996
	24	69	ND	87	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	Delgenes et al., 1996
	40	33	ND	47	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	Delgenes et al., 1996
	57	ND	ND	50	<i>S. cerevisiae</i> Baker yeast	Lee et al., 1999

Legenda: ND = não determinado; q_{Etanol} = Produtividade volumétrica do etanol em fase exponencial em relação à fermentação de referência; Y_{Etanol} = Rendimento em etanol ($g_{\text{Etanol}} / g_{\text{glicose consumida}}$) em relação à fermentação de referência.

Fonte: Adaptado de KLINKE et al., 2004.

Tabela 8 - Efeito de diferentes inibidores na fermentação por microrganismos fermentadores de pentoses. As percentagens são dadas como resultado na fermentação com composto adicionado em relação à fermentação de referência sem adição de composto

Composto	Conc. (mM)	Crescimento (%)	C _{Etanol} (%)	Y _{Etanol} (%)	Microrganismo	Referência
Ác. acético	150	ND	0	ND	<i>Z. mobilis</i> CP4(pzb5)	Ranatunga et al., 1997 ^{a,b}
	250	79	64	ND	<i>C. shehatae</i> ATCC 22984	Delgenes et al., 1996
	283	ND	78	ND	<i>E. coli</i> LY01	Zaldivar et al., 1999 b
	435	74	110	119	<i>T. mathranii</i> A3	Sommer, 1998
Ác.levulínico	172	15	ND	80	<i>E. coli</i> LY01	Zaldivar et al., 1999 b
Ác. vanílico	0,5	ND	101	ND	<i>Z. mobilis</i> CP4(pzb5)	Ranatunga et al., 1997 ^{a,b}
	10	85	101	101	<i>T. mathranii</i> A3M4	Klinke et al., 2001
	24	80	17	ND	<i>E. coli</i> LY01	Zaldivar et al., 1999 b
Ác.ferúlico	3	36	ND	80	<i>E. coli</i> LY01	Zaldivar et al., 1999 b
Furfural	10	ND	58	ND	<i>Z. mobilis</i> CP4(pzb5)	Ranatunga et al., 1997 ^{a,b}
	10	62	53	ND	<i>C. shehatae</i> ATCC 22984	Delgenes et al., 1996
	10	53	29	ND	<i>P. stripitis</i> NRRL Y 7124	Delgenes et al., 1996
	39	85	116	ND	<i>E. coli</i> LY01	Zaldivar et al., 1999
HMF	0,7	ND	80	ND	<i>Z. mobilis</i> CP4(pzb5)	Delgenes et al., 1996
	24	32	10	ND	<i>C. shehatae</i> ATCC 22984	Delgenes et al., 1996
	24	31	10	ND	<i>P. stripitis</i> NRRL Y 7124	Zaldivar et al., 1999
	36	96	106	ND	<i>E. coli</i> LY01	Zaldivar et al., 1999

Legenda: ND = não determinado; C_{Etanol} = Etanol produzido em relação à fermentação de referência em um determinado momento; Y_{Etanol} = Rendimento em etanol ($\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{consumido xilose}}}$) em relação à fermentação de referência.

Fonte: Adaptado de KLINKE et al., 2004.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

O projeto foi desenvolvido utilizando duas linhagens de laboratório referência para estudos fisiológicos e de genômica funcional, sendo uma haploide CEN.PK113-7D (VAN DIJKEN et al., 2000) e uma diplóide CEN.PK122 (VAN DEN BROEK et al., 2015), e duas linhagens industriais empregadas nas plantas de produção de etanol de cana-de-açúcar, e recentemente objeto de estudos científicos: JAY270 e SA -1 (ARGUESSO et al., 2009; BASSO et al., 2008; DELLA BIANCA et al., 2013), como visto na Tabela 9. Utilizaram-se também quatro isolados de bactérias lácticas provenientes da indústria de etanol 1G para o estudo comparativo com leveduras.

Tabela 9 – Linhagens de levedura usadas neste estudo.

Levedura	Características relevantes
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 113-7D	MATa, MAL2-8, SUC2
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 112	MATa, MATα
<i>S. cerevisiae</i> SA-1	MATa, MATα, SNA/SNZ ampliado
<i>S. cerevisiae</i> JAY270	Heterocatalítico, MATa, MATα, derivado PE-2

4.1.1 PREPARO DO BANCO DE ESTOQUE

Os microrganismos utilizados foram obtidos da coleção do Laboratório de Biotecnologia da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. As bactérias lácticas foram isoladas a partir de mosto fermentado de uma usina de etanol 1G localizada em Piracicaba e plaqueadas em meio sólido (MRS + cicloheximide ($C_{15}H_{23}NO_4$)).

As linhagens foram recebidas em meio de cultura sólido. Para o banco de leveduras, inoculou-se via raspagem 7 mL de meio YPD em tubos tipo *falcon* de 50 mL e incubadas overnight a 30°C e 150 rpm. De forma asséptica, foi pipetado ao meio 3 mL de glicerol estéril e aliqotado em tubos criogênicos de 1,5 mL, que foram devidamente catalogados e armazenados em ultra freezer a -80 °C. Esse estoque foi denominado “Estoque Mãe”. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito acima, empregando um dos tubos criogênicos do “Estoque Mãe” como inóculo do meio

YPD para formação do “Estoque de Trabalho”. Para o estoque das bactérias lácticas, o mesmo procedimento foi adotado, diferenciando-se apenas o meio de cultivo, neste caso foi utilizado o meio complexo MRS.

4.2 MEIOS DE CULTIVO

4.2.1.1 Meio definido

Os meios de cultivos foram preparados segundo metodologia descrita por Verduyn et al.(1992) e Luttik et al. (2000), de forma que três soluções foram preparadas separadamente, como mostrado na Tabela 10.

As soluções 1, 3 (vitaminas e elementos traços) foram filtradas em filtros estéreis com poros de diâmetros de 0,22 µm. Já a Solução 2, foi esterilizada em autoclave a 121°C (1 atmosfera) durante 20 minutos. Ao fim do preparo o pH foi ajustado para 6 com o auxílio de KOH.

Tabela 10 - Composição do meio de cultivo definido.

Reagente	Fórmula	Concentração	Observações
Fonte de carbono (Glicose)	$C_6H_{12}O_6$	$10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Solução 1
Fonte de nitrogênio (Ureia)	NH_2CONH_2	$2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	
Sulfato de potássio	K_2SO_4	$6,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	Solução 2
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	$MgSO_4\cdot 7H_2O$	$0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	$3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	
Solução de elementos-traço	-	$1,0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$	Solução 3
Solução de vitaminas	-	$1,0 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$	

A solução de elementos traços era composta dos seguintes compostos para conter por litro: EDTA, 15mg; $ZnSO_4\cdot 7H_2O$, 4,5mg; $CoCl_2\cdot 6H_2O$, 0,3mg; $MnCl_2\cdot 4H_2O$, 0,84mg; $CuSO_4\cdot 5H_2O$, 0,3mg; $CaCl_2\cdot 2H_2O$, 4,5mg; $FeSO_4\cdot 7H_2O$, 3mg; $NaMoO_4\cdot 2H_2O$, 0,4mg; H_3BO_3 , 1mg; KI, 0,1mg. As vitaminas para conter, por litro: biotina, 0,05 mg; pantotenato de cálcio, 1mg; ácido nicotínico, 1mg; inositol, 25mg; tiamina-HCl, 1mg; piridoxina-HCl, 1mg; e ácido para-aminobenzoico, 0,2mg.

4.2.1.2 Meios complexos

Os meios foram preparados como descrito nos itens a seguir e esterilizados a 121°C (1 atmosfera) por 20 minutos.

4.2.1.2.1 Meio YPD

O meio YPD empregado nesse estudo era composto por extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona bacteriológica 10 g.L⁻¹, D-(+)-Glicose 20 g.L⁻¹. Para meio YPD sólido, o mesmo foi feito com a adição de ágar 20 g.L⁻¹.

4.2.1.2.2 Meio MRS

O meio rico MRS utilizado para o cultivo de lactobacilos teve em sua composição: 10 g.L⁻¹ digestão enzimática de tecido animal 10 g.L⁻¹, extrato de carne bovina 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹; dextrose 20 g.L⁻¹; acetato de sódio 5 g.L⁻¹; polisorbato 80 1 g.L⁻¹; fosfato de potássio 2 g.L⁻¹; citrato de amônio 2 g.L⁻¹; sulfato de magnésio 0,1 g.L⁻¹; sulfato de manganês 0,05 g.L⁻¹.

4.3 HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS

As amostras de hidrolisados lignocelulósicos foram obtidas da empresa *Novozymes Latin America Ltda* (Amostras 1-4) e do CTBE - Centro de Tecnologia do Bioetanol (Amostra 5).

As amostras provenientes da empresa *Novozymes* passaram por um pré-tratamento do tipo explosão a vapor (STEX) com ácido fosfórico diluído (9,5 mg de H₃PO₄/g_{sólidos secos}) a 180°C por 5 minutos. O material pré-tratado (licor e lignina de celulose sólida) foi então hidrolisado com a mistura de enzimas Cellic® CTec3 a 50°C por 72 horas (Novozymes Latin America Ltd). A amostra fornecida pelo CTBE é um licor proveniente de um pré-tratamento hidrotérmico do bagaço da cana-de-açúcar com uma hidrólise ácida diluída (usando 0,4% (m/m) de H₂SO₄) sem a presença de enzimas.

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.4.1 CULTIVO EM FRASCO AGITADO

A caracterização fisiológica ($\mu_{\text{máx.}}$, $\text{OD}_{\text{máx.}}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$) das linhagens de levedura neste trabalho foi realizada através de cultivos em frascos agitados (Figura 19a) ou em tubos *falcon* de 50 mL (Figura 19b), com meio de cultura totalmente definido descrito por Verduyn et al. (1992). O cultivo com bactérias e leveduras na presença de um coquetel de inibidores foi realizado também em frascos agitados em meio complexo, MRS e YPD, respectivamente.

O inóculo para os cultivos foi obtido a partir da transferência de um criotubo do estoque de trabalho para um frasco Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 mL de meio sintético definido com ureia ou meio rico, conforme o experimento, e mantido em incubadora rotativa a 30°C e 150 rpm *overnight*. Após este tempo uma medida de absorbância foi feita e o volume de inóculo para o cultivo foi calculado de forma a se ter uma absorbância inicial (Abs_{600}) de 0,3.

Os cultivos em frascos agitados foram realizados em Erlenmeyers vedados com rolhas de silicone e incubados a 30°C e 150 rpm. Os cultivos de bactérias lácticas foram realizados a 37°C e agitação de 150 rpm.

O crescimento celular foi acompanhado pela medida de Abs_{600} em tempos pré-determinados e da medida de massa seca no final de cada cultivo, conforme metodologia descrita no item 4.5.1.

Amostragens eram feitas em intervalos pré-determinados de acordo com o experimento, com o auxílio de uma seringa para o sistema da Figura 19^a e por ponteiros estéreis para o sistema da Figura 19^b. Descartava-se um mL inicial de cada amostragem, garantindo que o volume “morto” do tubo não fosse aspirado na amostra coletada. Usualmente, amostravam-se de 2 a 3 mL de meio de cultivo. Prosseguia-se imediatamente para tomada de medida de absorbância e posteriormente a medida de pH, quando necessário.

O restante do meio, aproximadamente 1 mL, era filtrado em membrana Millipore de porosidade 0,22 µm, estéril diretamente nos *vials* de amostras de HPLC. Os vials eram identificados e congelados a – 20 °C até serem processados.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular foi determinada indiretamente por medidas de absorbância (Abs₆₀₀) via espectrometria em UV-VIS (espectrofotômetro UV-2600 da marca *Shimadzu*).

Ao final de cada cultivo em frasco agitado, a concentração celular foi determinada em termos de massa seca de células, para tal, uma alíquota foi filtrada a vácuo em membrana Millipore de porosidade 0,22 µm, o “*pellet*” celular formado foi lavado três vezes com água ultrapura (deionizada) a fim de retirar resquícios de compostos diferentes de massa celular. O “*pellet*” foi então levado ao forno micro-ondas numa potência de 180W por 15 min. A concentração foi calculado pela diferença da massa da membrana seca com o “*pellet*” e a massa da membrana seca dividida pelo volume de amostra utilizada na filtração. As medidas foram todas realizadas em duplicatas com variações menores que 5%. Para que esta determinação fosse precisa, utilizou-se um volume de amostra (10 mL) de forma que a massa seca de células retida na membrana estivesse entre 25 e 50 mg (OLSSON e NIELSON, 1997).

4.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS EXTRACELULARES E INTRACELULARES

Inicialmente foram construídas curvas padrões a partir de concentrações previamente conhecidas de soluções padrões dos compostos intra e extracelulares que possivelmente seriam encontrados, tendo como base os dados da literatura. Estas soluções foram preparadas em balão volumétrico nas concentrações mostradas na Tabela 23 do APÊNDICE A.

A determinação e concentração dos metabólitos extracelulares e intracelulares foram feitos via técnicas de cromatografia líquida como descrito a seguir, nos itens 4.5.3.1, 4.5.3.2 e 4.5.3.3.. Para tal, amostras foram coletadas durante todo o experimento, filtradas em membrana Millipore de porosidade 0,22 µm e armazenadas em freezer a -20°C.

4.5.2.1 Ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos, compostos intermediários do metabolismo celular da levedura/bactéria láctica e etanol foram determinados por técnicas de cromatografia líquida utilizando uma coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H, Bio-rad, Hercules, USA), utilizando-se como fase móvel H₂SO₄ (5 mM). O tempo de corrida foi de 25 min, com fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de forno de 60°C. O volume de injeção para todas as amostras foi de 10 µL. Utilizaram-se simultaneamente os detectores UV-Vis (PDA), em comprimentos de onda de 214 nm e detector de índice de refração (RID) ambos com temperatura de 50°C.

4.5.2.2 Derivados furânicos

A análise dos derivados furânicos (furfural e hidroximetilfurfural) seguiu a metodologia proposta por Gouveia (2009). Foi realizada em coluna C18 (Supelco Inc. modelo *waters Spherisorb* ODS-2 5 µm, 250 mm x 4,6 mm), utilizando como fase móvel solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético. As condições operacionais foram: fluxo de 0,8 mL min⁻¹; detector UV/VIS a 274 nm (temperatura de 50°C) e temperatura do forno de 25°C.

4.5.2.3 Compostos Fenólicos

A determinação e quantificação de compostos fenólicos presentes nas amostras de hidrolisados industriais foram baseadas na metodologia modificada de Kammerer et al. (2004). Inicialmente realizou-se um processo de extração a fim de retirar todo e qualquer material que pudesse vir a influenciar as análises. O processo de extração foi feito pesando alíquotas de 1g de hidrolisado em Erlenmeyers de 50 mL e acrescentando 5 mL de solução extratora composta por metanol e ácido clorídrico a 0,1%(v/v). O sistema ficou sob agitação de 150 rpm em temperatura ambiente por 2 h. Os extratos foram centrifugados por 10 min a 4000 rpm e temperatura ambiente, o material sobrenadante foi evaporado em *speed-vac* na temperatura de 30°C, e o resíduo foi dissolvido em 400 µL de fase móvel ácida (água/ ácido acético 2%) e o pH da amostra extraída foi corrigido com 10 µL de cloreto de sódio 5M. As amostras extraídas foram analisadas via cromatografia líquida de alta eficiência com coluna C18 da marca *Supelco Inc.* modelo *waters Spherisorb ODS-2* 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, tendo como fase móvel 2% (v/v) ácido acético em água (eluente A) e ácido acético 0,5% em água e acetonitrila (50:50, v/v; eluente B) utilizando um programa de gradiente: de 10 a 15% de B (10 min), de 15% de B isocrático (3 min), de 15 a 25% de B (7 min), de 25 a 55% de B (30 min), de 55 a 100% B (1 min), 100% B isocrático (5 min), de 100 a 10% B (0,1 min). O tempo total de execução foi de 60 min, com fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de forno de 30°C. O volume de injeção para todas as amostras foi de 10 µL. O monitoramento foi realizado em com detector UV, da marca *Shimadzu*, em comprimentos de onda de 280 nm e a 320 nm simultaneamente.

4.5.3 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

4.5.3.1 Identificação via técnica MALDI *Biotyper*

A identificação das bactérias lácticas foi realizada pelo sistema MALDI *Biotyper*, no qual foi utilizado para calibração a solução de *protein standard I*. Aproximadamente, 0,2 mg de amostra úmida dos microrganismos foram suspensas em 50 µL de ácido fórmico 70% (grau HPLC) e agitadas em vortex por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 30 µL de acetonitrila. A solução então foi sonicada por 15

minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 17.400 g. O sobrenadante contendo as proteínas extraídas (0,6 µL) foi colocado em uma placa para MALDI modelo MTP384, e, após a sua secagem à temperatura ambiente, foi adicionado 0,6 µL de solução saturada de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) solubilizada em 0,1% de ácido trifluoracético/acetonitrila (50:50 v/v). Após a secagem completa, as amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas Ultraflexxtreme (Bruker) equipado com uma fonte de ionização do tipo MALDI (laser “*smartbeam*” gerando íons positivos ou negativos) e analisador do tipo TOF (tempo de voo). As análises foram conduzidas utilizando o modo padrão MBT, que apresenta as seguintes condições de análise: em modo linear com frequência de 2000 Hz, voltagem de aceleração de 25,26 kV para a primeira fonte de íons, na placa, e 23,70 kV para a segunda fonte de íons, no eletrodo. Cada espectro foi coletado automaticamente em modo íon positivo com uma média de 10000 “*shots*”, e o intervalo de massas analisado foi de m/z 2–20 kDa (razão massa/carga).

A técnica MALDI-Biotyper permite a identificação em três níveis de confiança conforme é mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Níveis de confiança na identificação via MALDI-Biotyper.

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

4.5.3.2 Identificação via metodologia 16S

O DNA das bactérias lácticas (LAB's) foi extraído utilizando-se o kit MasterPure™ DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI). Colônias isoladas foram inoculadas com 5 mL de meio de cultura líquido e incubadas a 37°C por 24h, sob agitação constante. Após este período prosseguiu-se com a extração de DNA conforme instruções do fabricante.

O DNA genômico das bactérias foi empregado para a amplificação por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os *primers* para amplificar a região hipervariável V3-V4 do gene 16S. A reação foi realizada em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA),

com os seguintes parâmetros: 98°C por 30 s, 25 - 35 ciclos de 98°C por 10s, 25 - 35 ciclos de 98°C por 20s, 25 - 35 ciclos de 72°C por 30s e um ciclo final de 72°C por 5 min e aguardar até 12°C. Cada reação de 50 µL continha aproximadamente 250 ng de DNA total, 2,5 µL (10 µM) de Fw *primer* e Rv *primer*, 25 µL da enzima *Phusion HF Mastermix 2x*, o volume foi completado com água ultra pura até atingir o volume de 50 µL. Após a reação de PCR, procedeu-se para a purificação e limpeza do produto usando kit NucleoSpin® Gel e PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

O produto final foi usado para sequenciamento de Sanger. O produto deste sequenciamento foi comparado à data base de bacterial 16S DNA da NCBI, usando a ferramenta de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

4.6 CÁLCULO DE PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

O cálculo dos parâmetros fisiológicos foi feito utilizando o *software* Excel 2010 utilizados os dados da fase exponencial.

Para as curvas de crescimento, os valores de concentração celular em massa seca ($g_{DW} \cdot L^{-1}$) foram plotados versus o tempo. Para as curvas de consumo de substrato, o mesmo foi feito para a concentração da fonte de carbono ($g \cdot L^{-1}$) versus o tempo.

Para o cálculo das velocidades máximas específicas de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$; em $[h^{-1}]$), gerou-se um gráfico do logaritmo neperiano dos valores de concentração celular em massa seca ($g_{DW} \cdot L^{-1}$) versus o tempo. Aplicando regressão linear no trecho equivalente ao crescimento exponencial, foi possível obter o valor do coeficiente angular desta curva, que representa o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ em $[h^{-1}]$.

Para obtenção do fator de conversão de substrato em biomassa e rendimento celular, na fase exponencial, foi necessário gerar um gráfico com os valores de concentração celular em massa seca ($g_{DW} \cdot L^{-1}$) em função dos valores de concentração de substrato ($g_S \cdot L^{-1}$).

A velocidade específica de consumo de substrato (Equação 5) e a velocidade específica de produção de produto (Equação 6) foram determinadas segundo Schmidell et al. (2001).

$$q_s = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y_{X/S}} \quad (5)$$

$$q_p = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu_{m\acute{a}x} \quad (6)$$

4.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental (delineamento composto central rotacional - DCCR) foi empregado como o intuito de identificar os possíveis efeitos com a combinação de três compostos inibitórios. O DCCR examina a influência de diferentes fatores experimentais simultaneamente e a identificação de interações entre eles, o que não pode ser alcançado pela abordagem tradicional de um fator por vez (RODRIGUES e IEMMA, 2005; REZENDE et al., 2018). Para tal, foi empregado um DCCR de três fatores com pontos axiais e centrais, resultando em 21 ensaios distintos.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software* Statistica versão 10, o qual permitiu identificar as variáveis de entrada (concentração dos inibidores) que faziam efeito significativo nas variáveis respostas, assim como as possíveis interações entre os diferentes compostos.

Para este planejamento as variáveis independentes foram as concentrações de ácido *p*-cumárico, HMF e ácido acético, e as variáveis resposta foram velocidade específica máxima de crescimento, fator de conversão de substrato a biomassa, etanol e glicerol e velocidade específica de conversão de HMF.

A Tabela 12 apresenta a matriz de ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR), com os dados na forma real e codificada. Os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de garantir a independência estatística. Foram realizadas repetições no ponto central com a finalidade de avaliar o erro experimental e a repetibilidade dos experimentos. O valor de α foi escolhido para

rotabilidade, pois fornecem a propriedade preferencial da variação de previsão constante em todos os pontos que são equidistantes do centro de projeto, melhorando, assim, a qualidade da previsão.

Tabela 12 – Matriz de ensaios do delineamento composto central rotacional de 2^3 em ordem padrão.

Ensaio	Ácido <i>p</i> -cumárico (x1)	HMF (x2) (mM)	Ácido acético* (x3)
1	5,58 (-1)	5,70 (-1)	40,40 (-1)
2	8,42 (1)	5,70 (-1)	40,40 (-1)
3	5,58 (-1)	14,11 (1)	40,40 (-1)
4	8,42 (1)	14,11 (1)	40,40 (-1)
5	5,58 (-1)	5,70 (-1)	75,93 (1)
6	8,42 (1)	5,70 (-1)	75,93 (1)
7	5,58 (-1)	14,11 (1)	75,93 (1)
8	8,42 (1)	14,11 (1)	75,93 (1)
9	5,00 (-1,682)	9,91 (0)	58,28 (0)
10	9,00 (1,682)	9,91 (0)	58,28 (0)
11	7,00 (0)	3,96 (-1,682)	58,28 (0)
12	7,00 (0)	15,85 (1,682)	58,28 (0)
13	7,00 (0)	9,91 (0)	33,30 (-1,682)
14	7,00 (0)	9,91 (0)	83,26 (1,682)
15 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)
16 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)
17 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)
18 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)
19 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)
20 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)
21 (C)	7,00 (0)	9,91 (0)	58,28 (0)

*Todos os meios tiveram o pH fixado em 6,00 para impedir influências no crescimento devido ao pH.

Nos ensaios, foram realizadas medidas de absorbância, pH e concentração de metabólitos extra e intracelulares via cromatografia líquida conforme descrito anteriormente no item 4.5.2

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS INIBITÓRIOS PRESENTES EM HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Para a quantificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados industriais, realizou-se inicialmente o preparo de amostras padrão, o qual era conhecido precisamente, qualitativamente e quantitativamente, estes possíveis compostos tendo como base os dados reportados por Van der Pol (2015). Estas amostras contribuíram para a determinação dos tempos de retenção de cada composto em detectores de índice de refração a 50°C e de radiação ultravioleta no comprimento de 214 nm (para os compostos fenólicos, as leituras foram feitas em comprimentos de onda de 280 e 320 nm). Os tempos de retenção (Tabela 25) de cada composto inibitório, assim como de substrato, produto e subprodutos do metabolismo da fermentação por leveduras, e as respectivas curvas de calibração dos padrões encontram-se no APÊNDICE A.

Com os tempos de retenção de cada um dos compostos em cada detector, pode-se determinar qualitativamente e quantitativamente os compostos presentes em amostras de hidrolisados industriais como podem ser visto na Tabela 13. Na

Tabela 14, temos dados obtidos de diferentes estudos da literatura na qual observamos que os compostos mais abundantemente encontrados em nosso estudo são os mesmos por eles reportados (Almeida et al. 2007; Van der Pol et al. 2015). Dessa forma, neste estudo o ácido orgânico mais abundante encontrado nas amostras analisadas foi o ácido acético. Analogamente, o principal composto fenólico foi o ácido *p*-cumárico, enquanto que os derivados furânicos encontrados foram HMF e furfural. Os cromatogramas da identificação dos inibidores nas amostras são vistos no APÊNDICE B.

Tabela 13 – Identificação e quantificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados industriais de bagaço de cana-de-açúcar.

Inibidor	Concentração em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (g·L ⁻¹)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Ácido glicólico	0,226	1,430	0,390	0,740	0,380
Ácido acético	4,452	8,280	1,900	1,410	6,950
HMF	0,191	0,365	0,047	0,004	0,045
Furfural	0,934	1,066	0,113	0,020	0,008
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,420	0,276	0,108	ND	0,430
Ácido ferúlico	0,050	0,056	ND	ND	0,130
Ácido Vanílico	0,050	ND	0,044	ND	0,130

Legenda: ND= não detectado

Tabela 14 – Estudos de identificação e quantificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

Estudo	Concentração do inibidor em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (g·L ⁻¹)						
	Ácido glicólico	Ácido acético	HMF	Furfural	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido ferúlico	Ácido vanílico
Almeida et al. 2007 ^a	NR	4,40	0,60	1,90	NR	NR	NR
Van der Pol et al. 2015 ^b	4,54	13,93	0,98	7,73	1,57	0,189	0,38

^a Pré-tratamento de explosão á vapor^b Pré-tratamento ácido

Legenda: NR= não reportado.

5.2 AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS EM LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* LABORATORIAIS E INDUSTRIAIS

A fim de verificar a influência dos principais compostos inibitórios identificados em amostras industriais de hidrolisados obtido a partir de cana-de-açúcar sobre linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae*, realizaram-se os experimentos apresentados na Tabela 15. Nesses experimentos, as diferentes linhagens laboratoriais (CEN.PK113-7D e CEN.PK112) e industriais (JAY270 e SA-1) foram cultivadas em meio definido na presença de inibidores.

Tabela 15 - Concentrações máximas e mínimas testadas em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

	Inibidor		Tipo de inibidor
	Baixa Concentração (g·L ⁻¹)	Alta Concentração (g·L ⁻¹)	
Ácido acético	3,00 (50 mM)	12,01 (200 mM)	Ácido orgânico
Ácido levulínico	2,90 (25 mM)	23,22 (200 mM)	Ácido orgânico
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,41 (2,5 mM)	1,14 (7,0 mM)	Composto fenólico
Ácido ferúlico	0,09 (0,4 mM)	0,25 (1,3 mM)	Composto fenólico
HMF	2,00 (15,8 mM)	4,00 (31,7 mM)	Derivado furânico
Furfural	1,92 (20 mM)	3,84 (40 mM)	Derivado furânico

Apesar das análises apontarem a presença de ácido glicólico como segundo ácido mais presente em amostras de hidrolisados industriais, o estudo de avaliação do efeito de ácidos orgânicos foi feito com o ácido levulínico, uma vez que este ácido é produto da degradação de furanos (LUO et al., 2002) os quais confirmamos a presença, além deste composto já ser objeto de estudo do grupo onde o trabalho foi desenvolvido.

O estudo mostrou que a linhagem de *S. cerevisiae* SA-1 foi mais bem sucedida em meio contendo compostos inibitórios do que a linhagem referência CEN.PK113-7D, uma vez que a duração da fase *lag* (fase de adaptação) foi menor e a taxa de crescimento maior, na maioria dos casos investigados.

A Figura 20 mostra a robustez da linhagem industrial SA-1 perante as demais com relação aos inibidores da classe de ácidos orgânicos, uma vez que foi a única linhagem no qual foi obtido crescimento celular em meio com ácido acético em uma concentração de 3,00 g·L⁻¹. Tal fato se torna ainda mais interessante quando se analisa a Figura 21 e verifica-se que para este crescimento não foi necessário uma grande fase *lag*, confirmando a robustez da linhagem.

Cunha (2015) relata que concentrações de ácidos classificados como fracos, como o ácido acético, entre 1,90 e 3,00 g·L⁻¹ em leveduras do tipo laboratorial (CCUG53310) e industrial (PE-2), produzem grandes efeitos inibitórios sobre tais microrganismos. Dois mecanismos são propostos para explicar tal fato, segundo Russell (1992). A primeira teoria propõe que o acúmulo da forma dissociada do ácido dentro da célula (devido ao baixo pH extracelular) leva a uma acidificação intracelular e consequentes efeitos tóxicos em vários níveis do metabolismo celular

(RUSSELL, 1992). A segunda, conhecida como teoria de desacoplamento afirma que a diminuição do pH citoplasmático resultante do fluxo de ácidos fracos ativa as bombas de prótons dependentes de ATP para neutralizar o pH, levando a uma depleção de ATP (RUSSELL, 1992).

Figura 20 - Taxas específicas de crescimento para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de ácidos orgânicos

Legenda: Ac: Ácido acético; L: Ácido levulínico.

Figura 21 – Duração da fase *lag* para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de ácidos orgânicos.

Legenda: Ac: Ácido acético; L: Ácido levulínico.

A Figura 22 mostra a dificuldade da levedura em metabolizar o furfural, possuindo elevada fase *lag* para todas as linhagens, sendo as linhagens laboratoriais mais afetada pelos furaldeídos, sendo a CEN.PK 112 mais afetada no

parâmetro taxa máxima de crescimento e a CEN.PK 113-7D no parâmetro duração da fase *lag*, a qual não apresentou nenhum tipo de crescimento. A linhagem SA-1 foi a que apresentou melhor desempenho, quando analisamos taxa de crescimento (Figura 22) e fase *lag* (Figura 23) em conjunto. O crescimento observado é garantido segundo Cunha (2015) devido a possibilidade da *S. cerevisiae* converter furfural e HMF em alcoóis correspondentes menos tóxicos. A redução do furfural é preferencialmente dependente do NADH, enquanto a redução do HMF tem sido principalmente associada ao consumo de NADPH (WAHLBOM e HAHN-HAGERDAL, 2002). Essas reduções fornecem NADP⁺ suficiente para regeneração NADPH, mantendo um equilíbrio redox durante a desintoxicação desses compostos (LIU et al., 2009).

Figura 22 – Duração da fase *lag* para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de furaldeídos.

Legenda: F: furfural; H: HMF

Figura 23 - Taxas específicas de crescimento para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de furaldeídos.

Legenda: F: furfural; H: HMF;

Analisando a influência dos compostos fenólicos na fase *lag* (Figura 24) e na taxa de crescimento (Figura 25) das linhagens estudadas, se pode observar que as linhagens industriais mostram melhor desempenho em comparação com as linhagens laboratoriais. A linhagem SA-1 mostrou-se novamente superior perante as demais, apresentando tempo de fase *lag* próximo do ensaio controle e taxa máxima de crescimento pouco influenciada pela presença do composto inibidor. Estudos feitos por Adeboye et al. (2015), reportam uma taxa máxima de crescimento de $0,29 \text{ h}^{-1}$ (para concentração de 9, mM de ácido *p*-cumárico), enquanto este trabalho apresentou uma taxa de $0,158 \text{ h}^{-1}$ para uma concentração de 7,00 mM para a levedura industrial SA-1, a única na qual foi observado crescimento nesta faixa de concentração de inibidor fenólico.

Figura 24 – Duração da fase *lag* para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de compostos fenólicos

Legenda: C: Ácido *p*-cumárico; Fe: Ácido ferúlico.

Figura 25 - Taxas específicas de crescimento para cada uma das linhagens nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores da classe de compostos fenólicos.

Legenda: C: Ácido *p*-cumárico; Fe: Ácido ferúlico.

Na Tabela 16 é apresentado, de forma resumida, o período de fase *lag*, o crescimento máximo e a máxima absorvância (Abs_{600}) das linhagens CEN.PK 113-7D, CEN.PK 112, SA-1 e JAY 270, respectivamente, para cada uma das concentrações de inibidores.

Tabela 16 – Fase *lag*, taxa de crescimento máximo e máxima absorbância para as 4 linhagens.

CEN.PK 113-7D					
	Concentração (g·L⁻¹)	Fase <i>lag</i> (h)	$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	OD600_{máx}	Inibição do $\mu_{\text{máx}}$ (%)
Controle		1	0,306±0,156	6,97	0
Ácido acético	3,00	-	-	-	-
	12,01	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,41	6	0,261±0,018	5,19	-14,7
	1,14	-	-	-	-
Ácido ferúlico	0,09	9	0,155±0,013	7,21	-49,3
	0,25	9	0,145±0,006	5,20	-52,6
Ácido levulínico	2,90	24	0,108±0,006	4,90	-64,7
	23,22	-	-	-	-
HMF	2,00	-	-	-	-
	4,00	-	-	-	-
Furfural	1,92	33	0,160±0,001	-	-70,0
	3,84	-	-	-	-
CEN.PK 112					
Controle		1	0,167±0,002	2,99	0
Ácido acético	3,00	-	-	-	-
	12,01	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,41	6	0,167±0,002	2,95	-45,6
	1,14	26	0,020±0,025	0,171	-93,4
Ácido ferúlico	0,09	3	0,119±0,006	2,68	-61,2
	0,25	3	0,153±0,0004	2,29	-50,1
Ácido levulínico	2,90	6	0,073±0,002	1,62	-76,2
	23,22	-	-	-	-
HMF	2,00	6	0,056±0,0003	1,07	-81,7
	4,00	-	-	-	-
Furfural	1,92	-	-	-	-
	3,84	-	-	-	-
SA-1					
Controle		1	0,269±0,001	8,86	0
Ácido acético	3,00	26	0,108±0,0001	4,72	-74,0
	12,01	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,41	3	0,262±0,019	8,57	-37,0
	1,14	6	0,158±0,026	2,59	-62,0
Ácido ferúlico	0,09	3	0,271±0,003	5,97	-34,9
	0,25	3	0,234±0,018	9,73	-43,7
Ácido levulínico	2,90	6	0,256±0,015	6,14	-38,5
	23,22	-	-	-	-
HMF	2,00	6	0,146±0,0008	8,26	-64,9
	4,00	6	0,112±0,006	6,63	-73,1
Furfural	1,92	12	0,080±0,003	7,92	-80,7
	3,84	-	-	-	-
JAY270					
Controle		1	0,169±0,0006	4,88	0
Ácido acético	3,00	-	-	-	-
	12,01	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,41	3	0,091±0,007	2,35	-61,2
	1,14	-	-	-	-
Ácido ferúlico	0,09	3	0,119±0,003	2,80	-49,3
	0,25	3	0,140±0,005	2,40	-40,3
Ácido levulínico	2,90	12	0,106±0,001	2,89	-54,8
	23,22	-	-	-	-
HMF	2,00	3	0,139±0,014	1,41	-40,7
	4,00	6	0,070±0,003	1,19	-70,1
Furfural	1,92	24	0,081±0,002	1,25	-65,4
	3,84	-	-	-	-

5.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO EM LEVEDURAS

Estudos recentes, como os conduzidos por Nwuche et al. (2018) e Cunha et al. (2015), avaliaram o efeito de diferentes inibidores em linhagens da levedura *S. cerevisiae*, principalmente ácido acético e furfural, um ácido orgânico e um derivado furânico, respectivamente. Neste trabalho, todavia, atentou-se em avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido *p*-cumárico, o principal inibidor da classe de fenólicos encontrado em substratos lignocelulósicos obtidos a partir de cana-de-açúcar (Tabela 9; VAN DER POL et al., 2015), e ainda pouco reportado na literatura (ADEBOYE et al., 2014).

Inicialmente realizou-se uma varredura de diferentes concentrações do inibidor na levedura laboratorial de referência, CEN.PK 113-7D, sendo possível observar que esta linhagem tolera uma concentração máxima de $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 mM), em concentrações superiores, não foi observado nenhum tipo de crescimento, o qual indica a taxa limite de toxicidade deste composto na levedura CEN.PK113-7D, como sendo 5 mM, valor próximo ao reportado por Adeboye et al. (2014), para a levedura Ethanol Red (8,5 mM).

Na Figura 26, observa-se que o inibidor afeta na fase *lag* (fase de adaptação), apresentando um maior comprometimento para o crescimento em concentrações intermediárias de $0,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo este tempo seis vezes maior que o observado no ensaio controle (ensaio sem o acréscimo de nenhum tipo de composto que inibiria o crescimento celular da levedura). O efeito sobre a duração da fase *lag* não foi observado no estudo conduzido com a levedura industrial Ethanol Red, uma linhagem empregada na indústria do etanol de milho (ADEBOYE et al., 2014).

Na Figura 27, são demonstrados comparativamente os dados de velocidade específica de crescimento máxima para as mesmas condições. Neste caso observa-se que o maior efeito inibitório foi observado para a concentração de $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 mM) deste composto fenólico. Para os fatores de conversão de substrato a célula ($Y_{X/S}$), a etanol ($Y_{E/S}$), e a glicerol ($Y_{GLI/S}$) (Figura 28), um padrão não pode ser observado.

Figura 26 – Duração da fase *lag* para diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido *p*-cumárico em linhagem CEN.PK 113-7D

Figura 27 – Taxa máxima de crescimento celular para diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido *p*-cumárico em linhagem CEN.PK 113-7D

Figura 28 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), célula ($Y_{X/S}$) e glicerol ($Y_{GLI/S}$) para diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de ácido *p*-cumárico em linhagem CEN.PK 113-7D

A partir desta análise inicial em levedura laboratorial, concluiu-se que a máxima concentração de ácido *p*-cumárico suportada pela linhagem CEN.PK 113-7D foi de $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 mM). Sendo assim, realizou-se um cultivo em frasco agitado de duas leveduras industriais (SA-1 e JAY 270) nesta mesma concentração.

Analisando-se as curvas de crescimento apresentada na

Figura 29, pode-se notar um melhor desempenho para a levedura industrial SA-1, a qual apresentou $\mu_{\text{máx}}$ médio de $0,3276 \pm 0,0043 \text{ h}^{-1}$, enquanto a linhagem JAY 270, também industrial, teve um valor médio de $0,2678 \pm 0,0235 \text{ h}^{-1}$. Assim, observou-se que as duas leveduras tiveram um aumento de 32,09 e 7,98%, respectivamente, em comparação à linhagem laboratorial (CEN.PK 113-7D). A Legenda: Valores em uma mesma coluna, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Figura 30 apresenta os fatores de conversão de substrato a biomassa, a etanol e a glicerol.

A diferença significativa das amostras foi comprovada estatisticamente pela realização do teste ANOVA, nos casos onde o coeficiente F foi maior que $F_{\text{crítico}}$ e o valor-P menor que o nível de significância de 0,05, indicando que estes se diferem estatisticamente. Assim, realizou-se o teste de *Tukey* a fim de verificar quais linhagens possuíam diferenças significativas entre os parâmetros analisados. Os parâmetros de velocidade específica de crescimento máximo e o fator de conversão de substrato a glicerol apresentaram esta diferença e são mostrados na Tabela 17, onde se verifica que as amostras com letras diferentes na mesma coluna se diferem estatisticamente com um nível de confiança de 95%. Com relação aos fatores de conversão de substrato a biomassa e a etanol, não se pode afirmar estatisticamente a mesma diferença.

Figura 29 – Curva de crescimento celular na presença de $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido *p*-cumárico para diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Tabela 17 – Parâmetros fisiológicos na presença de $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido *p*-cumárico para diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

Linhagem	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$Y_{\text{GLVS}} \left(\frac{\text{gGLI}}{\text{gGLC}} \right)$	$Y_{\text{XS}} \left(\frac{\text{gDW}}{\text{gGLC}} \right)$	$Y_{\text{E/S}} \left(\frac{\text{gE}}{\text{gGLC}} \right)$
CEN.PK 113-7D	$0,2481 \pm 0,0096^b$	$0,0354 \pm 0,0021^c$	$0,1236 \pm 0,0171^a$	$0,3807 \pm 0,0289^a$
SA-1	$0,3276 \pm 0,0043^a$	$0,0491 \pm 0,0052^b$	$0,1174 \pm 0,0062^a$	$0,3392 \pm 0,0513^a$
JAY 270	$0,2678 \pm 0,0235^b$	$0,0532 \pm 0,0100^a$	$0,1091 \pm 0,0021^a$	$0,3340 \pm 0,0215^a$

Legenda: Valores em uma mesma coluna, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Figura 30 – Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{\text{P/S}}$) e célula ($Y_{\text{X/S}}$) para $0,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido *p*-cumárico

5.4 ESTUDO COMPARATIVO DO CULTIVO NA PRESENÇA DE INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS ENTRE BACTÉRIAS LÁCTICAS E LEVEDURAS LABORATORIAIS E INDUSTRIAIS

Nos processos industriais de produção de etanol combustível a base de cana-de-açúcar, as leveduras não são as únicas protagonistas. Bactérias lácticas estão

presentes em todas as usinas (DELLA-BIANCA et al., 2013; BASSO et al., 2014), e certamente estarão presentes nos processos de segunda geração. Assim, 4 isolados bacterianos, oriundos do processo de primeira geração, foram avaliados na presença de alguns inibidores selecionados. A Tabela 18 contém a classificação das bactérias lácticas. No APÊNDICE C é apresentado o relatório gerado pelo *software* MALDI-*biotyper*.

Tabela 18 - Identificação de microrganismos (bactérias lácticas) via diferentes métodos.

Nome	Tipo	Classificação via software MALDI-Biotyper	Classificação via técnica 16S
LAB1	Hetero	Não determinado	Não determinado
LAB2	Hetero	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> DSM 8742 DSM	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> ATCC=25302
LAB3	Homo	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> DSM 20008 DSM	<i>Lactobacillus paracasei ssp tolerans</i> ATCC=25599
LAB4	Homo	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i> DSM 20020 DSM	<i>Lactobacillus paracasei ssp tolerans</i> ATCC=25599

Na Figura 31, são apresentadas as curvas de crescimento das bactérias lácticas LAB1, LAB2, LAB3 e LAB4, respectivamente, com e sem a adição do coquetel inibitório composto (em g·L⁻¹) por 4,6 de ácido acético; 0,17 de HMF; 0,68 de furfural; e 0,31 de ácido *p*-cumárico. Esse coquetel foi baseado nos compostos identificados nas amostras de hidrolisado previamente analisadas (item 5.1). Analisando a fração de inibição em relação ao controle (expresso como ($\mu_{\text{máx inibidor}}/\mu_{\text{máx controle}}$) observaram-se valores de 0,56, 0,50, 0,21 e 0,47 para os isolados LAB1, LAB2 LAB3 e LAB4, respectivamente. O grupo de *L. casei* consiste em bactérias homofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas, sendo estas últimas atribuídas às espécies *L. paracasei*, *L. zeae* e *L. rhamnosus* (ANGELIS e GOBBETTI, 2015).

O interesse do estudo das bactérias lácticas em condições industrialmente relevantes para a produção de biocombustíveis, deve-se ao fato de que tais linhagens são tolerantes aos vários estresses presentes nesses processos, tais como altas concentrações de etanol e sais, e extremos de pH e temperatura (BOSMA et al., 2017). Dessa maneira, é pertinente avaliar seu desempenho, em

termos de crescimento e de conversão do substrato, na presença de inibidores lignocelulósicos.

A Tabela 19 apresenta dados fisiológicos das quatro bactérias lácticas avaliadas anteriormente.

Figura 31 - Curva de crescimento das bactérias lácticas LAB1(a), LAB2(b), LAB3(c) e LAB4(d).

Tabela 19 – Dados de crescimento celular para bactérias lácticas.

Linhagem	Tipo	Fator de conversão de substrato				Balanço de C (%)
		Lactato	Acetato	Etanol	Biomassa	
LAB1	Hetero	0.584	0.277	0.115	0.113	114
LAB2	Hetero	0.632	0.308	0.094	0.168	126
LAB3	Homo	1.113	0,000	0,000	0.237	153
LAB4	Homo	1.113	0,000	0,000	0.242	140

Por outro lado, como pode ser observado na Figura 32, tanto a levedura laboratorial CEN.PK113 -7D (Figura 32a), como a linhagem industrial SA-1 (Figura 32b), não apresentaram crescimento, sendo totalmente inibidas pelo mesmo complexo inibitório ao qual as bactérias lácticas foram submetidas.

Figura 32 - Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae*, (a) CEN.PK 113-7D e (b) SA-1

5.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

No intuito de investigar os efeitos conjuntos de um ácido orgânico (ácido acético), um derivado furânico (HMF) e um composto fenólico (ácido p-cumárico), sobre os parâmetros fisiológicos da levedura SA-1, um delineamento composto central rotacional (DCCR), foi realizado. Mais especificamente, foi investigada a influência desses três compostos inibitórios, provenientes do pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar, sobre os principais parâmetros fisiológicos, a saber: velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), e fatores de conversão de substrato a célula ($Y_{X/S}$), a etanol ($Y_{E/S}$), e a glicerol ($Y_{GLI/S}$), e velocidade específica de conversão de HMF (q_{HMF}). Estes compostos foram escolhidos com base nos estudos mostrados no item 5.2, o qual mostrou quais foram os inibidores que mais influenciaram nos parâmetros fisiológicos da levedura.

Os limites de concentração dos inibidores utilizados no planejamento experimental mostrados na Tabela 20 foram escolhidos com base nos estudos previamente feitos neste trabalho, assim como em dados reportados na literatura por Baptista (2013) e Colombi et al. (2017). Na Tabela 21 é apresentada a matriz de ensaios (valores reais) e os resultados das variáveis respostas, ou seja, os parâmetros fisiológicos.

Tabela 20 – Valores reais e níveis dos fatores estudados para o DCCR em configuração estrela.

Variáveis	Níveis				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,00	5,58	7,00	8,42	9,00
HMF	3,96	5,70	9,91	14,11	15,85
Ácido acético	33,30	40,40	58,28	75,93	83,26

Tabela 21 – Planejamento DCCR com pontos axiais e centrais da avaliação dos inibidores na fermentação por leveduras.

Padrão	Ácido <i>p</i> -cumárico	HMF	Ácido acético	$\mu_{\text{máx}}$	$Y_{X/S}$	$Y_{E/S}$	$Y_{GL/S}$	q_{HMF}
	(mM)			(h ⁻¹)	$\left(\frac{g_{\text{DW}}}{g_{\text{GLC}}}\right)$	$\left(\frac{g_{\text{ETH}}}{g_{\text{GLC}}}\right)$	$\left(\frac{g_{\text{GLI}}}{g_{\text{GLC}}}\right)$	$\left(\frac{g_{\text{HMF}}}{h \cdot g_{\text{DW}}}\right)$
1	5,58	5,70	40,40	0,282	0,097	0,422	0,014	0,118
2	8,42	5,70	40,40	0,268	0,086	0,436	0,031	0,094
3	5,58	14,11	40,40	0,181	0,067	0,423	0,034	0,294
4	8,42	14,11	40,40	0,184	0,063	0,399	0,029	0,233
5	5,58	5,70	75,93	0,292	0,109	0,488	0,016	0,114
6	8,42	5,70	75,93	0,226	0,076	0,477	0,012	0,154
7	5,58	14,11	75,93	0,178	0,068	0,484	0,033	0,283
8	8,42	14,11	75,93	0,160	0,057	0,489	0,035	0,306
9	5,00	9,91	58,28	0,227	0,066	0,484	0,027	0,283
10	9,00	9,91	58,28	0,204	0,062	0,488	0,024	0,218
11	7,00	3,96	58,28	0,308	0,105	0,406	0,013	0,104
12	7,00	15,85	58,28	0,181	0,057	0,460	0,034	0,411
13	7,00	9,91	33,30	0,223	0,093	0,474	0,025	0,222
14	7,00	9,91	83,26	0,211	0,066	0,478	0,023	0,199
15 (C)	7,00	9,91	58,28	0,236	0,092	0,478	0,019	0,166
16 (C)	7,00	9,91	58,28	0,211	0,085	0,476	0,025	0,211
17 (C)	7,00	9,91	58,28	0,220	0,081	0,452	0,030	0,268
18 (C)	7,00	9,91	58,28	0,218	0,088	0,446	0,040	0,302
19 (C)	7,00	9,91	58,28	0,236	0,099	0,421	0,023	0,161
20 (C))	7,00	9,91	58,28	0,237	0,104	0,490	0,030	0,178
21 (C)	7,00	9,91	58,28	0,248	0,109	0,506	0,027	0,149

A Tabela 22 apresenta os efeitos estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância, e reparametrizados ($p < 0,05$) para cada variável resposta avaliada. A Tabela 23 a análise de variância (ANOVA).

Tabela 22 – Efeito das variáveis para os parâmetros fisiológicos.

Fator	Efeito	Erro padrão	p-Valor
$\mu_{\text{máx.}}$			
Média	0,225317	0,002884	0,000000
Ácido <i>p</i> -cumárico (L)	-0,019528	0,007152	0,034158
HMF (L)	-0,084727	0,007152	0,000022
1L by 3L	-0,018223	0,009344	0,099028
$Y_{x/s}$			
Média	0,088417	0,002840	0,000000
Ácido <i>p</i> -cumárico (Q)	-0,018530	0,005312	0,013014
HMF (L)	-0,028369	0,005589	0,002276
$Y_{E/s}$			
Média	0,460732	0,006321	0,000000
Ácido acético (L)	0,038833	0,015676	0,047985
$Y_{GLI/s}$			
Média	0,025900	0,001457	0,000002
HMF (L)	0,013667	0,003613	0,009154
q_{HMF}			
Média	0,212700	0,012829	0,000003
HMF (L)	0,168770	0,031816	0,001822

Legenda: (L): termo linear; (Q): termo quadrático; 1L by 3L: interação linear da concentração de ácido *p*-cumárico com a concentração de ácido acético.

Tabela 23 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de 2ª ordem para os parâmetros fisiológicos.

$\mu_{\text{máx.}}$					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,026482	3	0,008827	39,3845	3,20
Resíduos	0,00381	17	0,000224		
Falta de ajuste	0,002763	11	0,000251		
Erro puro	0,001048	6	0,000175		
Total	0,030292	20	0,001515		
$Y_{X/S}$					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,004361	3	0,001454	13,11668	3,20
Resíduos	0,001884	17	0,000111		
Falta de ajuste	0,001244	11	0,000113		
Erro puro	0,000640	6	0,000107		
Total	0,006245	20	0,000312		
$Y_{E/S}$					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,005149	1	0,005149	6,695434	4,38
Resíduos	0,014611	19	0,000769		
Falta de ajuste	0,009577	13	0,000737		
Erro puro	0,005034	6	0,000839		
Total	0,019759	20	0,000988		
$Y_{GLI/S}$					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,000638	1	0,000638	21,40234	4,38
Resíduos	0,000566	19	2,98E-05		
Falta de ajuste	0,000299	13	2,3E-05		
Erro puro	0,000267	6	4,46E-05		
Total	0,001204	20	6,02E-05		
q_{HMF}					
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,097249	1	0,097249	49,67095	4,38
Resíduos	0,037199	19	0,001958		
Falta de ajuste	0,016463	13	0,001266		
Erro puro	0,020736	6	0,003456		
Total	0,134448	20	0,006722		

Legenda: S.Q.= soma dos quadrados; G.L.= grau de liberdade; Q.M.= quadrado médio dos desvios.

A partir dos efeitos estatisticamente significativos, construiu-se as Equações (7), (8), (9), (10) e (11) que apresentam o modelo reparametrizados e o respectivo coeficiente de regressão (R^2) para os dados de velocidade máxima de crescimento celular, para os fatores de conversão de substrato a biomassa, etanol e glicerol e para a velocidade específica de conversão de HMF, respectivamente.

$$\mu_{m\acute{a}x.} = 0,225317 - 0,019529 x_1 - 0,084727 x_2 - 0,018223 x_1 x_3 \quad (7)$$

$$R^2 = 0,87422$$

$$Y_{X/S} = 0,088417 - 0,018530 x_1^2 - 0,028369 x_2 \quad (8)$$

$$R^2 = 0,647661$$

$$Y_{E/S} = 0,460732 + 0,038833 x_3 \quad (9)$$

$$R^2 = 0,26057$$

$$Y_{GLI/S} = 0,025900 + 0,013667 x_2 \quad (10)$$

$$R^2 = 0,52973$$

$$q_{HMF} = 0,212700 + 0,168770 x_2 \quad (11)$$

$$R^2 = 0,72332$$

Legenda: x_1 = ácido *p*-cumárico; x_2 = HMF; x_3 = ácido acético.

Analizando-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ e do coeficiente de regressão (R^2), temos que apenas o modelo para a velocidade específica de crescimento máxima é válido, uma vez que este parâmetro possui $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e $R^2 \geq 0,80$.

Analizando-se os efeitos obtidos, nota-se que alguns dos compostos investigados resultam em efeitos negativos quando analisado o parâmetro resposta, como nos parâmetros $\mu_{m\acute{a}x.}$ e $Y_{X/S}$, consequentemente diminuindo seus valores com o aumento da concentração dos inibidores. Por outro lado, o $Y_{E/S}$ é inversamente afetado pelo aumento da concentração, o qual com o aumento da concentração de ácido acético aumenta esse parâmetro. Esses efeitos serão discutidos em maiores detalhes nos próximos itens.

A partir do modelo estatisticamente significativo para a velocidade específica de crescimento máxima foram obtidas as superfícies resposta. Para as demais variáveis resposta, foi analisado o efeito das variáveis independentes por meio de Gráficos de Pareto, como apresentado e discutido nos itens a seguir.

5.5.1 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MÁXIMA

Analizando-se as superfícies respostas da interação dos inibidores estudados para o parâmetro velocidade específica de crescimento máxima tem-se o HMF como o composto de maior toxicidade, como observado na Figura 33 e Figura 35. A toxicidade dos furaldeídos pode ser explicada por uma reorientação da energia da levedura para a fixação do dano causado pelos compostos e pela redução de ATP intracelular e dos níveis de NADPH, quer por inibição enzimática ou por consumo/regeneração de cofatores (ALMEIDA et al., 2007), o HMF particularmente, pode causar o acúmulo de lipídeos, diminuição da concentração de proteínas na

célula da levedura e interferências na atividade de algumas enzimas (triose-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase e piruvato desidrogenase) (MACHADO et al., 2011).

Na Figura 34 nota-se que o ácido *p*-cumárico possui um efeito tóxico linear o qual é potencializado pela presença do ácido acético, diminuindo a velocidade máxima específica de crescimento.

Estudos realizados por Chandel et al. (2011), relatam que a presença de furanos (HMF) e ácidos orgânicos (ácido acético) são altamente nocivos para o crescimento microbiano. Tal nocividade se deve ao fato da presença destes compostos reduzirem a atividade biológica da célula da levedura. Já os compostos fenólicos (ácido *p*-cumárico) afetam a bioconversão fermentativa, inibindo a atividade enzimática, inibindo também a replicação das células, ocasionando desta forma menor taxa de crescimento (CHANDEL, 2011 e HEIPIEPER et al., 1994).

Apesar da toxicidade observada, nota-se claramente a robustez da linhagem SA-1, uma vez que foi possível observar crescimento celular em altas concentrações destes compostos em conjunto, o qual anteriormente testado separadamente em outras linhagens como visto no item 5.2 e 5.3, inibiu completamente o seu crescimento.

Figura 33 – Superfície resposta do efeito dos inibidores ácido *p*-cumárico e HMF na velocidade específica de crescimento máxima.

Figura 34 – Superfície resposta do efeito dos inibidores ácido *p*-cumárico e ácido acético na velocidade específica de crescimento máxima.

Figura 35 - Superfície resposta do efeito dos inibidores HMF e ácido acético na velocidade específica de crescimento máxima.

5.5.2 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO A CÉLULA

Analisando o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 36, nota-se que apenas as concentrações de HMF e ácido *p*-cumárico possuem efeitos negativos estatisticamente significativos para um nível de significância de 5%, sobre o fator de conversão de substrato a célula. O primeiro tem um efeito linear ao passo que o segundo tem um efeito quadrático.

Figura 36 – Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes no fator de conversão de substrato a células.

5.5.3 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO A ETANOL

Para o parâmetro de fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{E/S}$) têm-se a ausência de efeito dos inibidores ácido *p*-cumárico e HMF para o fator de conversão de substrato a etanol, sendo apenas a concentração de ácido acético estatisticamente significativa para um nível de significância de 5% (Figura 37), o que condiz com dados presentes na literatura como mostrado por VAN MARIS et al. (2006) e WEI et al., (2013).

A presença de ácido acético independente da presença de outro composto possui efeito positivo linear no fator de conversão de substrato a etanol, aumentando tal parâmetro com o aumento de sua concentração, assim como publicado por VAN MARIS et al. (2006). Este aumento é explicado, segundo (WEI et al., 2013) por a levedura utiliza o ácido acético como fonte de carbono, levando tanto a produção de biomassa como de etanol.

O estudo desenvolvido por Baptista (2013) relata que a presença de HMF em baixas concentrações não afeta a fermentação alcoólica, uma vez que este inibidor é metabolizado a 2,5-bishidroximetilfurano, um derivado álcool do HMF resultante do

metabolismo da levedura face ao HMF e cuja existência já foi descrita por alguns autores (LIU et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007). Estes resultados permitem concluir que a levedura é capaz de converter este inibidor num produto menos tóxico ocorrendo à fermentação paralelamente ao desaparecimento do HMF. Esta característica representa um mecanismo de adaptação por parte da levedura a condições de stress resultantes da presença do inibidor no meio de cultura, revelando uma maior capacidade de tolerância ao HMF (BAPTISTA, 2013).

Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) relatam que os efeitos dos compostos inibidores são mais evidentes sobre o crescimento do que sobre a produção de etanol, uma vez que a levedura é capaz de se adaptar a estes. Estudos revelaram que $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de HMF inibiu em 33% a produção de etanol, enquanto que $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ associado á $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural inibiram em 22%.

Figura 37 - Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes no fator de conversão de substrato a etanol.

5.5.4 FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO A GLICEROL

Para o fator de conversão de substrato a glicerol ($Y_{GLI/S}$) tem-se que o HMF é o único inibidor que causa um efeito significativo (Figura 38), sendo este positivo, não sofrendo influência do ácido *p*-cumárico e ácido acético. Tal fato não se torna

interessante e deve ser minimizado, uma vez que para sintetizar o glicerol durante a produção anaeróbia de etanol, a levedura *S. cerevisiae* desvia de 5 – 8% fornecido no processo (BASSO, BASSO E ROCHA, 2011), ou seja, o aumento de sua produção causaria uma queda na produção de etanol, produto de interesse do processo fermentativo.

Estudos feitos por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) relatam que sob condições anaeróbias de fermentação, o glicerol é normalmente produzido para regenerar o excesso de NADH formado na biossíntese (OURA, 1977). Desta forma, a produção de glicerol mostrou-se significativamente reduzida durante a redução de furaldeídos como o HMF, sugerindo que a redução do furaldeído leva a regeneração do NAD⁺(PALMQVIST et al., 1999).

Figura 38 - Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes no fator de conversão de substrato a glicerol.

5.5.5 VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CONVERSÃO DE HMF

Análises via cromatografia líquida mostraram que o composto HMF, na grande maioria dos casos, foi completamente consumido durante o cultivo. Essa observação condiz com o que está reportado na literatura, a qual mostra que o composto é reduzido ao seu álcool correspondente 5-hidroximetil furfurílico

(PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000), composto que possui menor efeito tóxico sobre a levedura em relação ao composto inicial. Em vista deste fato, calculou-se a velocidade específica de conversão de HMF (q_{HMF}) nos ensaios do planejamento experimental. Este fator foi calculado de acordo com a Equação (12).

$$q_{HMF} = \frac{1}{Y_{X/HMF}} \cdot \mu_{máx}. \quad (12)$$

Na análise feita pelo software, apenas o termo linear para diferentes concentrações de HMF possuiu um efeito estatisticamente significativo para este caso, como observado no gráfico de Pareto apresentado na Figura 39.

Figura 39 - Gráfico de Pareto para avaliar o efeito das variáveis independentes na velocidade específica de conversão de HMF.

6 CONCLUSÕES

A identificação e quantificação dos principais compostos inibidores lignocelulósicos via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), mostrou-se uma ferramenta poderosa e acessível para caracterização destes. Técnicas mais refinadas, como a utilização da espectrometria de massas, auxiliariam na obtenção de resultados mais refinados e, descartariam a necessidade de soluções padrão para tal identificação. Os principais inibidores identificados nas amostras industriais foram ácido glicólico e ácido acético, dentre os ácidos orgânicos. Esses foram identificados em todas as amostras analisadas. Em relação aos furaldeídos, foram detectados furfural e 5-hidroximetil-furufural (HMF) em todas as amostras analisadas. Os principais e mais abundantes compostos fenólicos identificados pelo sistema foram ácido *p*-cumárico (em 4 de 5), ácido ferúlico (em 3 de 5) e ácido vanílico (em 3 de 5).

A avaliação do efeito tóxico de alguns destes compostos em 4 diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* (2 linhagens laboratoriais e 2 industriais), mostrou a maior tolerância da linhagem industrial (SA-1) sobre as demais linhagens. A grande maioria dos inibidores teve um impacto significativamente menor nessa linhagem, considerando as três medidas analisadas ao longo deste projeto: taxa máxima de crescimento, produção de biomassa e duração da fase *lag*. Este fato corrobora a hipótese de que as linhagens industriais tendem a ser mais resistentes a condições adversas e, portanto, são os melhores candidatos como microrganismos plataforma (chassis) no desenvolvimento de linhagens para a indústria do etanol 2G. Este estudo também mostrou que, para as concentrações avaliadas, ácidos fracos (como o ácido acético e o levulínico) tiveram o efeito mais inibitório em todas as linhagens estudadas, em relação aos demais compostos avaliados. Os compostos fenólicos, por outro lado, tiveram um menor efeito inibitório nas concentrações estudadas. De forma geral, a linhagem industrial *S. cerevisiae* SA-1 se mostrou mais tolerante frente às demais linhagens, em praticamente todas as condições analisadas.

Ao comparar a resistência frente aos inibidores lignocelulósicos entre bactérias lácticas e leveduras laboratoriais, notou-se uma potencial robustez das bactérias

frente às leveduras, uma vez que as últimas foram incapazes de crescer no meio de cultivo acrescido de um coquetel de inibidores, enquanto que as bactérias cresceram. Cabe destacar, no entanto, que essas apresentaram uma considerável redução na velocidade específica de crescimento em comparação ao meio sem acréscimo de inibidores.

Por fim, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), foi possível analisar estatisticamente os efeitos provocados pela presença de três inibidores de diferentes classes, provenientes do pré-tratamento do bagaço da cana. Com essa metodologia experimental, verificou-se que a maior toxicidade (redução da velocidade específica de crescimento máxima) para a levedura SA-1 foi exercida pelo composto da classe dos furanos, o HMF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **Amb Express**, v. 4, n. 1, p. 46, 2014.
- ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; ALDAEUS, F.; LARSSON, P. T.; OLSSON, L. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 149, 2015.
- ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. *Lactobacillus spp.*: general characteristics. 2015.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Journal of chemical technology and Biotechnology*, v. 82, n. 4, p. 340–349. 2007.
- ALMEIDA, J. R.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUNDZ, M. F.; S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, n. 4, p. 625, 2009.
- ALLEN, S. A.; CLARK, W.; MCCAFFERY, J. M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 2, 2010.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 91, n. 5, p. 1267-75, 2004.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 91. p. 1267. Jul./ 2011.

- ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, n. 6, p. 567-570, 1986.
- ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A., DUARTE, F.M. ; NETTO, O.V.C. ; MISSAWA, S.K. ; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F. ; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; CCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2258-2270, 2009.
- ASK, M., BETTIGA, M., DURAISWAMY, V. R., & OLSSON, L.. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 181, 2013.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105 2008.
- BAPTISTA, C. V. R. **Efeitos inibitórios do hidroximetilfurfural na fermentação alcoólica: avaliação por citometria de fluxo**. 2013. Tese de Doutorado. ISA.
- BARROS, R. Energia para um novo mundo. Rio de Janeiro: Monte Castelo Ideias, 160 p., 2007.
- BARROS, T. D.; JARDINE, J. G. Etanol. Agro energia. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2016. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj07rcuq02wyiv802hvm3j2838bue.html#>. Acessado em: 02/09/2016.
- BASSO, L. C; AMORIM, H. V; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, Fev./2008.

- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. InTech, 2011.
- BASSO, T. O.; GOMES, F. S.; LOPES, M. L.; DE AMORIM, H. V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 169-177, 2014.
- BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinaria. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.
- BOTHAST, R.J.; SAHA, B. C. Microbial production of xylitol. 1997.
- BNDES. RELATÓRIO ANUAL BNDES. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social,1983-. Anual. Continuação de Relatório das Atividades BNDE. 2008.
- BRASIL. **Bioetanol de cana-de-açúcar Energia para o desenvolvimento sustentável**. 1ª ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 314p. ISBN 9788587545244
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**.v.54, n. 1, p.519-546. 2003.
- BOSMA, E. F.; FORSTER, J.; NIELSEN, TOFTGAARD, A. Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories–Evaluation of strain properties and genetic tools. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 419-442, 2017.
- BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.;RAMAKRISHNAN, S. “Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review,” **Enzyme Research**, vol. 2011, Article ID 787532, 17 pages, 2011.

- 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.
- CASPETA, L.; CASTILLO, T.; NIELSEN, J. Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 184, 2015.
- CASTRO, R. C. A. **Seleção de uma linhagem termo tolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina da palha de arroz**. 2011. 103p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena – São Paulo, 2011.
- CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V. Weddy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: Advancing the generation of 'Biofuel'. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.89, p. 1289-1303, 2011.
- CHOWDHURY, S.; SMITH, K. W.; GUSTIN, M. C. Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. **The Journal of Cell Biology**, v. 118, n. 3, p. 561-571, 1992.
- CLARK, T. A.; MACKIE, K. L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 101-110, 1984.
- COLOMBI, B. L.; ORTIZ, M. A.; ZANONI, P. R. S.; MAGALHÃES, W. L. E.; TAVARES, L. B. B. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Engevista**, v. 19, n. 2, p. 339-352, 2017.
- CUNHA, J. T.; AGUIAR, T. Q.; ROMANÍ, A.; OLIVEIRA, C.; DOMINGUES, L. Contribution of PRS3, RPB4 and ZWF1 to the resistance of industrial

- Saccharomyces cerevisiae CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors, **Bioresource Technology**, v. 191, p. 7-16, 2015.
- D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSEIL, I.; STEWART, G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 365-372, 1988.
- DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; 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.
- DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT A. K. What do we know about the yeast strains from the brazilian fuel ethanol industry. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 97, n. 3, p. 979-991, 2013.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry ultra struture, reactions. **Walter de Gruyter**, v. 613, p. 1960-82, 1984.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 618-628, 2002.
- GLASSER, W. G.; KELLY, S. S. **Encyclopedia of Polymer Science and Engeneering**. Identification to lignin. New York, John Wiley & Sons, Inc. Lignin. v.8, p.796-849, 1987.
- GÓMEZ RUEDA, S. M.. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas – São Paulo. 110f. 2010.
- HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORDWA-GRAUSLUNG, M. F.; LIDEN, G. ZACCHI, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, p.549-556, 2006.

- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.
- HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J. KEWELOH, H. BONT, J. A. M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.12, p. 409-415, 1994.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v.100; n.1, p.10-18. 2009.
- HENRISSAT, B. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, p. 309-316. 1991.
- HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology REVIEWS**, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.
- HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; MCMULLIN, Z.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A. J.; COOTE, P. J. Activity of the plasma membrane H (+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3158-3164, 1996.
- HUMBIRD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; SEXTON, D. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States), 2011.
- HSU, T. A.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–319, 1980.

- IBEAS, J. I.; JIMENEZ, J. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 7-12, 1997.
- JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. **Yeast**, v. 3, n. 4, p. 223-232, 1987.
- JÖNSSON, L.J., MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Biosource Technology**. v. 199. p. 103 – 112. 2016.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.
- JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Yield-determining factors in high solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.
- KAMMERER, D.; ACHIM C.; REINHOLD C.; ANDREAS S. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360-4367, 2004.
- KEWELOH, H.; WEYRAUCH, G.; REHM, H. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 66-71, 1990.
- KLINKE, H. B.; OLSSON, L.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 738-747, 2003.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by

Thermoanaerobacter mathranii. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 5-6, p. 631-638, 2001.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.66, n.1, p. 10-26, 2004.

KO, J. K.; UM, Y., PARK, Y. C.; SEO, J. H.; KIM, K. H. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. **Applied MICROBIOLOGY and Biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4201-4212, 2015.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KUBOTA, S.; TAKEO, I.; KUME, K.; KANAI, M.; SHITAMUKAI, A.; MIZUNUMA, M.; HIRATA, D. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 968-972, 2004.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225-257, 2005.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1991.

LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JÖNSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. p. 617-632.

LEE, W. G.; LEE, J. S.; SHIN, C. S.; PARK, S. C.; CHANG, H. N.; & CHANG, Y. K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. In: **Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, 1999. p. 547-559. 1999.

- LEIBBRANDT, N. H.; KNOETZE, J. H.; GÖRGENS, J. F. Comparing biological and thermochemical processing of sugarcane bagasse: an energy balance perspective. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, n 5, p. 2117-2126, 2011.
- LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos estudos - CEBRAP**, São Paulo, n. 78, p. 15-21, 2007.
- LIMA, A. M. **Estudos recentes e perspectivas da viabilidade técnico-econômica da produção de etanol lignocelulósico**. Circular Técnica 05. ISSN 2177-4420. Brasília. 2011.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345-352, 2004.
- LIU, Z. L.; SAHA, B. C.; SLININGER, P. J. Lignocellulosic biomass conversion to ethanol by *Saccharomyces*. J. Wall, Harwood C, Demain A (eds) *Bioenergy*. **ASM Press**, Washington DC, p 17–36. 2008.
- LIU, Z. L.; M. A.; M., SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 282, p. 233–244, 2009.
- LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809-825, 2011.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V. & PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

- LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, n. 2, p. 125-138, 2002.
- LUTTIK, M. A. H.; KOTTER, P.; SALOMONS, F. A.; VAN DER KLEI, I. J.; PRONK, J. T. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 24, p. 7007-7013, 2000.
- MACEDO, I. C. Feasibility of Biomass-Derived Ethanol as a Fuel for Transportation. **Project ME-T1007 - ATN/DO-9375-ME**, 2006.
- MACEDO, I. C. Situação Atual e Perspectivas do Etanol. **Estudos Avançados**, v. 21.n. 59, p. 157 - 165, Campinas, 2007.
- MACHADO, A. S. Adaptação de *Spathaspora arborariae* a altas concentrações de compostos furânicos e seu perfil cinético para produção de etanol na presença de 5-hidroximetilfurfural e furfural. 2011.
- MARTÍN, C.; JONSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, n. 3-4, p.386-395, 2003.
- MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; VALENTE, M. S.; SOUSA, L. C.; BONOMI, A. M. F. L. J.; JESUS, C. D. F. D.; JUNQUEIRA, T. L. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar: uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, n. 41, 2015.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise de madeira *pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p.461–470, 2005.

- MORO, M. K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca**. 2015. 107p. Dissertação (mestrado). UFRJ/COPPE Programa de Engenharia Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 96. p. 673-686. 2005.
- NYKO, D. GARCIA, J. L. F.; MILANEZ, A. Y.; DUNHAM, F. B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 32, p. 5-48. 2010.
- NWUCHE, C. O.; MURATA, Y.; NWEZE, J. E.; NDUBUISI, I. A.; SAITO, H. O. M.; OGBONNA, J. C. Bioethanol production under multiple stress condition by a new acid and temperature tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain LC 269108 isolated from rotten fruits, **Process Biochemistry**, 2018.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa, **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.
- OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, 2003. p. 141-153.
- OLSSON, L.; NIELSON, J. On-line and in-situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**. v. 5, n. 12, p. 517-522, 1997.
- OLIVÉRIO, J. L.; HILST, A. G. P. DHR-DEDINI Rapid Hydrolysis – Revolutionary process for producing alcohol from sugar cane bagasse. **Proc. ISSCT**. 2005.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentation. **Process Biochem.**, v. 12, p. 19-21, 1977.

- PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HAEGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46-55, 1999.
- PALMQVIST, E; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.
- PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 375-380, 1990.
- PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry. An introduction to their industrial utilization**. Elsevier Science Publishers BV, 1989.
- PIPER, P. W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 339-355, 1993.
- PROCÓPIO, D. P. **Estudo da expressão heteróloga de celulasas de *Acremonium strictum* em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* visando a produção de bioetanol de segunda geração**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos – Campinas, SP: [s.n.], 2017.
- QUINELATO, C. **Métodos de extração da lignina do bagaço de cana-de-açúcar do noroeste do estado de São Paulo**. 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto – São Paulo, 2016.
- RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração** / Sarita Cândida Rabelo. - Campinas, SP: [s.n.], 2010.

- RAÍZEN. Tecnologia em energia renovável – Etanol de segunda geração. 2017. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em: 13 Fev. 2017.
- RANATUNGA, T. D.; JERVIS, J.; HELM, R. F.; MCMILLAN, J. D.; HATZIS, C. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) xylose fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 185, 1997.
- RANATUNGA, T. D.; JERVIS, J.; HELM, R. F.; MCMILLAN, J. D.; HATZIS, C. Toxicity of hardwood extractives toward *Saccharomyces cerevisiae* glucose fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 11, p. 1125-1127, 1997.
- RASMUSSEN, H.; SORENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, v. 385, p. 45-57, 2014.
- RENEWABLE AND FUEL ASSOCIATION. Ethanol industry statistics 2010. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>. 2011.
- REZENDE, C. A.; ATTA, B. W.; BREITKREITZ, M. C.; SIMISTER, R.; GOMEZ, L. D.; MCQUEEN-MASON, S. J. Optimization of biomass pretreatments using fractional factorial experimental design. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 206, 2018.
- RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para cogeração de energia elétrica e etanol celulósico**. São Joaquim da Barra: Iara Coimbra, 25p. 2008.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, 2005.

- ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O Etanol de Segunda Geração: Limites e oportunidades. **Revistas do BNDES**, Rio de Janeiro, n.32, p. 117-156, Dez.2009.
- ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, SV; ROTHMAN, H. **Uso da biomassa para a produção de energia na indústria brasileira. Campinas, São Paulo: Unicamp. 2005.**
- ROSSELL, S.; VAN DER WEIJDEN, C. C.; LINDENBERGH, A.; VAN TUIJL, A.; FRANCKE, C.; BAKKER, B. M.; WESTERHOFF, H. V. Unraveling the complexity of flux regulation: a new method demonstrated for nutrient starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2166-2171, 2006.
- RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v.454, p. 841-845, 2008.
- RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low ph – anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 73, p. 363–37, 1992.
- SADDLER, J. N.; RAMOS, L. P.; BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. **Biotech. Agric. Ser.**, v. 9, p. 73-91, 1993.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERIEE, S.; AIKA, T. K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.
- SALANTI, A.; ZOIA, L.; ORLANDI, M.; ZANINI, F.; ELEGIR, G. Structural characterization and antioxidant activity evaluation of lignins from rice husk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58. n. 18, p. 10049-10055. 2010.
- SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

- SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher; v, 2, 251p., 2001.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.[s.n], 2010.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1999. p. 152-178.
- SHI, N.-Q.; JEFFRIES; T. W. Anaerobic growth and improved fermentation of *Pichia stipitis* bearing a URA1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 339-345, 1998.
- SHULER, M. K; KARGI, G. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall PTR. 2017.
- SKERKER, J. M.; LEON, D.; PRICE, M. N.; MAR, J. S.; TARJAN, D. R.; WETMORE, K. M.; DEUTSCHBAUER, A. M.; BAUMOHL, J. K.; BAUER, S.; IBANEZ, A. B. Dissecting a complex chemical stress: chemogenomic profiling of plant hydrolysates. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 1, p. 674, 2013.
- SOMMER, P. **Conversion of hemicellulose and D-xylose into ethanol by the use of thermophilic anaerobic bacteria**. Department of Environmental Science and Engineering, Technical University of Denmark., 1998.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

- SUN, R.; LAWTHOR, J. M.; BANKS, W. B. Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 4, p. 325-331, 1996.
- TAHERZADEH, M. J.; EKLUND, R.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v. 36, n. 11 p. 4659–4665, 1997.
- TENGBORG, C.; STENBERG, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G.; LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HANGERDAL, B. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, p.3-15, 1998.
- TIMAR-BALAZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation**. Routledge, 1998.
- UNICA: União da Indústria de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. 2012.
- UNICA: União da Indústria de cana-de-açúcar. Relatório final da safra 2016/2017 da região Centro-Sul. 2016.
- UNICA: União da Indústria de cana-de-açúcar. Relatório final da safra 2018/2019 da região Centro-Sul. 2018.
- VAN DEN BROEK, M.; BOLAT, I.; NIJKAMP, J. F.; RAMOS, E.; LUTTIK, M. A.; KOOPMAN, F.; DARAN, J. M. Chromosomal copy number variation in *Saccharomyces pastorianus* is evidence for extensive genome dynamics in industrial lager brewing strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6253-6267, 2015.
- VAN DER POL, E.; BAKKER, R.; VAN ZEELAND, A.; GARCIA, D. S.; PUNT, A.; EGGINK, G. 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 DIJKEN, J. P.; BAUER, J.; BRAMBILLA, L.; DUBOC, P.; FRANCOIS, J. M.; GANCEDO, C.; GIUSEPPIN, M. L.; HEIJNEN, J. J.; HOARE, M.; LANGE, H. C.; MADDEN, E. A.; NIEDERBERGER, P.; NIELSEN, J.; PARROU, J. L.; PETIT, T.; PORRO, D.; REUSS, M.; VAN RIEL, N.; RIZZI, M.; STEENSMA, H. Y.; VERRIPS, C. T.; VINDELOV, J.; PRONK, J. T. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme Microbiology Technology** 26:706-714, 2000.

VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A. VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**. v. 90, n. 4, p.391-418, 2006.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VANDIJKEN, J. P. Effect of benzoic-acid on metabolic fluxes in yeasts – a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**. v. 8, p. 501-17, 1992.

VIEGAS, C. A.; SÁ-CORREIA, I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. **Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 645-651, 1991.

WAHLBOM, C. F., HAHN-HAGERDAL, B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 78, p. 172– 178, 2002.

- WEI, N.; QUARTERMAN, J.; KIM, S. R.; CATE, J. H.; JIN, Y. S. . Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nature Communications**, v. 4, 2013.
- WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.
- WYMAN, C. E.; HINMAN, N. D. Ethanol. Fundamentals of production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel. **Applied Biochemical and Biotechnology**. 24/25:735-753, 1990.
- ZALDIVAR, J.; INGRAM, L. O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. **Biotechnology and bioengineering**, v. 66, n. 4, p. 203-210, 1999.
- ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 65, n. 1, p. 24-33, 1999.
- ZAUTSEN, R. R. M. **Fermentação alcoólica e extração líquido-líquido simultânea de etanol e inibidores provenientes de caldo hidrolítico de biomassa lignocelulósica**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, São Paulo, [s.n.], 2011.

APÊNDICE A

Tabela 24 – Compostos da curva de calibração utilizados para identificação via HPLC.

Substância	Marca	Grau de pureza (%)	Concentração (g·L ⁻¹)	
			Desejada	Corrigida
Glicose	Sigma Aldrich	≥ 99,5	20,00	19,937
Etanol	TEDIA	99,5	10,00	10,060
Glicerol	Merck	99-100,5	5,00	5,018
Ácido succínico	Merck	99,0	1,00	1,055
Ácido láctico	Sigma Aldrich	≥ 99,0	1,00	1,015
Ácido acético	Synth	99,7	10,00	9,907
Ácido levulínico	Sigma Aldrich	98	20,00	19,693
Ácido glicólico	Sigma Aldrich	99	10,00	10,269
HMF	Sigma Aldrich	> 99,0	5,00	4,962
Furfural	Sigma Aldrich	99,0	5,00	4,907
Ácido <i>p</i> -cumárico	Sigma Aldrich	≥ 98,0	0,164	0,164
Ácido ferúlico	Sigma Aldrich	≥ 99,0	0,152	0,195
Ácido vanílico	Sigma Aldrich	99,0	0,194	0,149

Tabela 25 – Identificação do tempo de retenção dos compostos inibidores em hidrolisados lignocelulósicos.

Composto	Classificação	Tempo de retenção (min)	
		RID	PDA
Ácido oxálico	Ácido orgânico	6,896	6,613
Ácido alfa-cetoglutárico		8,323	8,032
Ácido málico		9,541	9,249
Ácido pirúvico		9,563	9,274
Ácido succínico		11,510	11,210
Ácido glicólico		12,236	11,941
Ácido láctico		12,722	12,428
Ácido fumárico		13,386	13,115
Ácido levulínico		15,434	15,138
Ácido acético		14,987	14,687
HMF	Furaldeído	28,731	28,429
Furfural		42,917	42,622
Ácido caféico	Composto fenólico*	-	19,234
Ácido vanílico		-	23,797
Ácido <i>p</i> -cumárico		-	27,497
Ácido ferúlico		-	31,849

Legenda: RID: Detector de índice de refração; PDA: Detector de arranjo de diodos. *Os compostos fenólicos foram detectados apenas em detector PDA nos comprimentos de onda de 280 e 320 nm.

Figura 40 - Curva de calibração de padrão de ácido acético no detector RID.

Figura 41 - Curva de calibração de padrão de ácido levulínico no detector RID.

Figura 42 - Curva de calibração de padrão de HMF no detector RID.

Figura 43 - Curva de calibração de padrão de furfural no detector RID.

Figura 44 - Curva de calibração de padrão de ácido *p*-cumárico no detector UV-Vis.

Figura 45 - Curva de calibração de padrão de ácido ferrulico no detector UV-Vis.

Figura 46 – Curva de calibração de padrão de ácido vanílico no detector UV-Vis.

APÊNDICE B

Figura 47 – Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 1.

Figura 48 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 1.

Figura 49 - Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 1.

Figura 50 - Cromatograma da identificação dos ácidos orânicos na amostra 2

Figura 51 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 2.

Figura 52 - Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 2.

Figura 53 - Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 3

Figura 54 – Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 3.

Figura 55 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 3.

Figura 56 - Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 4.

Figura 57 – Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 4.

Figura 58 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 4.

Figura 59 - Cromatograma da identificação dos ácidos orgânicos na amostra 5.

Figura 60 - Cromatograma da identificação dos compostos fenólicos na amostra 5.

Figura 61 - Cromatograma da identificação dos derivados furânicos na amostra 5.

APÊNDICE C

Figura 62 – Quadro com a identificação e o range das bactérias lácticas estudadas.

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>11</u> (-)(C)	LAB_1	no peaks found	<u>< 0</u>	no peaks found	<u>< 0</u>
<u>12</u> (-)(C)	LAB_1	not reliable identification	<u>1.338</u>	not reliable identification	<u>1.28</u>
<u>13</u> (++)(A)	LAB_2	Lactobacillus paracasei	<u>2.007</u>	Lactobacillus paracasei	<u>1.92</u>
<u>14</u> (++)(A)	LAB_2	Lactobacillus paracasei	<u>2.015</u>	Lactobacillus paracasei	<u>1.862</u>
<u>15</u> (++)(A)	LAB_4	Lactobacillus paracasei	<u>2.008</u>	Lactobacillus paracasei	<u>1.964</u>
<u>16</u> (++)(A)	LAB_4	Lactobacillus paracasei	<u>2.162</u>	Lactobacillus paracasei	<u>2.159</u>
<u>17</u> (++)(A)	LAB_5	Lactobacillus paracasei	<u>2.284</u>	Lactobacillus paracasei	<u>2.231</u>
<u>18</u> (+++)(A)	LAB_5	Lactobacillus paracasei	<u>2.309</u>	Lactobacillus paracasei	<u>2.295</u>

Legenda: I1 e I2: LAB1
 I3 e I4: LAB2
 I5 e I6: LAB3
 I7 e I8: LAB4