

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSOS EM TECNOLOGIA QUÍMICA**



BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM ÁCIDO LÁTICO

Michelle da Cunha Abreu Xavier

Engenheira de Alimentos

Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Saartje Hernalsteens

Co-Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas- São Paulo

Junho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

X18b Xavier, Michelle da Cunha Abreu
Bioconversão de xilose em ácido láctico /
Michelle da Cunha Abreu Xavier. --Campinas, SP:
[s.n.], 2011.

Orientadores: Telma Teixeira Franco, Saartje
Hernalsteens.

Dissertação de Mestrado - Universidade
Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia
Química.

1. Ácido láctico. 2. Bagaço de cana. 3.
Lactobacilo. 4. Fermentação. I. Franco, Telma
Teixeira. II. Hernalsteens, Saartje. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Xylose bioconversion to lactic acid

Palavras-chave em Inglês: Lactic acid, Sugarcane bagasse, *Lactobacillus*,
Fermentation

Área de concentração: Processos em Tecnologia Química

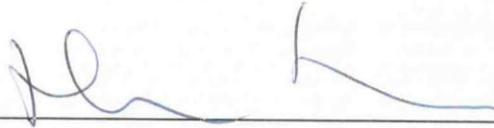
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossel, Jonas Contiero

Data da defesa: 29-06-2011

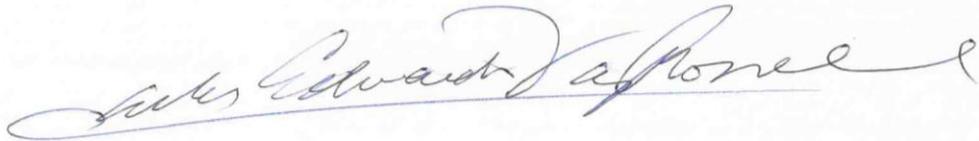
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Michelle da Cunha Abreu Xavier e aprovada em 29 de junho de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

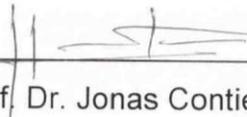


Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco

Orientador



Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell



Prof. Dr. Jonas Contiero

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química.



Prof.^a. Dr.^a. Telma Teixeira Franco
Orientador (a)

DEDICATÓRIA

A meus pais, Geraldo e Ireni
A meus avós, Miguel e Celina (*in memoriam*)
A meus irmãos, Júnior, Edvan, Maguiânia e Magna
A meu tio, Raimundo
Pelo amor incondicional, força e apoio total.

Com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e bênçãos a mim concedidas, pela saúde e força para seguir lutando pelos meus objetivos e por todas as graças alcançadas.

Agradeço aos meus pais, Geraldo Xavier e Ireni Abreu, pelo amor incondicional e por sempre estarem me apoiando em tudo na vida, por entenderem a minha ausência física diante da saudade insuportável e dos momentos especiais. Pela motivação de sempre seguir em frente e nunca deixar-me desistir no caminho, por acreditar que sempre posso vencer e por serem a minha força e a base de tudo na minha vida. À minha mãe, um exemplo de pessoa e mulher guerreira e de grande coração e por ser para mim a melhor mãe do mundo e quem admiro incondicionalmente e amo sem medida. Ao meu pai, um exemplo de humildade, por me dar tanto carinho e amor, por sempre torcer pelo meu êxito e quem amo demais.

Agradeço aos meus avós, Miguel Abreu e Celina da Cunha (*In memoriam*) por terem feito parte da minha vida por muito tempo e terem deixado boas lembranças de amor, fé, carinho, companheirismo, luta, ensinamentos e acima de tudo, deixaram imensas saudades que serão eternas.

Agradeço ao Juarez Mandu pelo apoio, admiração e por estar ao lado da minha mãe fazendo com que ela se sinta menos a minha ausência.

Agradeço aos meus irmãos Geraldo Júnior, Edvan, Maguiânia e Magna por sempre torcerem e acreditarem em mim e pelo amor e carinho a mim confiados.

Agradeço ao meu tio Raimundo Abreu pelo apoio, carinho, por acreditar na minha capacidade, pelo incentivo à minha carreira e por toda preocupação comigo.

Agradeço em especial, ao meu namorado Sergio por ter cruzado o meu caminho e estar sempre ao meu lado me apoiando, dando forças nos momentos mais difíceis não me deixando desistir dos meus sonhos e por me dar tanta felicidade enchendo meu coração de alegria pelo simples fato de tê-lo ao meu lado. Pela dedicação, cumplicidade e por ser um homem muito amoroso e

carinhoso fazendo dos meus dias os melhores da minha vida. Agradeço por tudo, pois esse sonho que aqui foi conquistado, não teria sido possível sem você, e é uma conquista nossa.

Agradeço à minha orientadora Telma Franco pela orientação, por acreditar no meu trabalho e na minha pessoa, pela oportunidade de aprendizagem que me ajudou a crescer pessoal e profissionalmente e por me possibilitar obter este novo título.

Agradeço a minha co-orientadora Saartje pela co-orientação e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos Jaiver e Vinícius, pelo companheirismo, amizade, cumplicidade e por serem como irmãos para mim. Agradeço pelos momentos de descontração, pelas risadas, pelos choros de alegria e tristeza, pelas viagens, pelos almoços de fim de semana e principalmente por fazerem parte da minha vida e tornar mais fácil nossa estadia aqui sem a nossa família. Obrigada pelas ajudas nas disciplinas que, às vezes, parecia impossível e por me ajudar a tornar possível este sonho.

Agradeço à Giselle pela amizade e carinho, pelos ensinamentos a mim passados, por me ajudar nos momentos de dúvidas experimentais e científicas e pelos momentos de alegria.

Agradeço a Ana Deckmann pela ajuda e carinho e ao Fernando Frederico pelo auxílio com o cromatógrafo e paciência.

Agradeço ao pessoal do laboratório pela companhia, pelos momentos de descontração, pela convivência do dia-a-dia e por ajudar a sanar dúvidas laboratoriais.

Agradeço ao amigo Silvino pelo total apoio e por ser sempre muito prestativo.

Agradeço à todos que não foram mencionados mas que uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimentos deste trabalho.

A todos muito obrigada!!

“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência.”

Henry Ford

“Nenhuma mente que se abre para uma nova idéia voltará a ter o tamanho original.”

Albert Einstein

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht

RESUMO

A produção do ácido lático vem recentemente aumentando devido à sua importância como precursor na fabricação de plásticos biodegradáveis, o polilactato (PLA). Devido à preocupação com a redução do custo da matéria-prima, o uso de materiais lignocelulósicos como fonte de carbono barata para a produção de ácido lático é bastante atraente. O bagaço de cana-de-açúcar, disponível em abundância no Brasil, representa grande potencial como matéria-prima para fermentação, por ser fonte renovável de carbono para obtenção de blocos construtores de interesse industrial, tais como o ácido lático (AL). O Neste contexto, o presente trabalho foi delineado para estudar a produção de ácido lático a partir da xilose, principal constituinte da fração hemicelulósica presente no bagaço de cana-de-açúcar. Nosso estudo explorou o uso de duas preparações distintas de biomassa antes de seu uso no processo fermentativo: a água de lavagem de bagaço de cana (MRS) e do hidrolisado do bagaço de cana (MRS_{HBC}). Para a bioconversão de interesse, foram selecionadas 9 cepas de *Lactobacillus* capazes de assimilar xilose, identificadas através de um teste *screening* para acidificação em placas de Agar sólido e ensaios de fermentação em incubador rotativo. O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 foi a cepa que apresentou maior produtividade, sendo selecionado para estudos posteriores. As fermentações dos meios MRS_{xilose} e MRS na ausência de xilose mostraram que o microrganismo produz ácido acético a partir dos componentes presentes no meio (tais como, peptona A, extrato de levedura e peptona de soja). Os resultados da fermentação em batelada em meio MRS_{ALB} indicaram que o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 fermentou eficientemente pentoses (xilose e arabinose) também na presença de glicose, atingindo 2,37 g/L de ácido lático e 0,99 g/L de ácido acético, que representa um rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,65 g/g e ($Y_{P/S}$) de 0,27 g/g, respectivamente. O *B. coagulans* 162 apresentou melhor rendimento de ácido lático ($Y_{P/S} = 0,85$ g/g) e produtividade ($Q_P = 0,35$ g/[L.h]) em relação ao *L. pentosus* ATCC 8041 quando o meio MRS_{ALB} foi utilizado como meio de fermentação. Resultados da fermentação em batelada em meio MRS_{HBC} revelaram que a glicose foi o primeiro açúcar a ser esgotado, seguido de xilose. Nestas condições de fermentação, o *L. pentosus* ATCC 8041 produziu 28,99 g/L de ácido lático ($Y_{P/S} = 0,78$ g/g), enquanto que o ácido acético alcançou uma concentração final de 8,19 g/L ($Y_{P/S} = 0,21$ g/g). O D(-)-ácido lático foi a forma isomérica produzida, representando de 53 a 66% do ácido lático total sintetizado pelo *L. pentosus* ATCC 8041. A maior assimilação de xilose foi observada quando a peptona A foi substituída por uréia na fermentação do meio MRS_{xilose} pelo *L. pentosus* ATCC 8041. Assim, a fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, mais difícil de ser metabolizada que a fração celulósica pode ser considerada matéria-prima promissora para processos de bioconversão, como a produção de ácido lático, representando uma fonte de menor custo, renovável e rica em açúcares fermentescíveis.

Palavras-chave: ácido lático, *Lactobacillus*, bagaço de cana-de-açúcar, xilose, fermentação.

ABSTRACT

The demands for lactic acid production are increasing in the last few years due to its use as precursor for the synthesis of biodegradable plastics, also known as polylactic acid (PLA) bioplastics. In order to reduce the production costs, which are mainly dependent on the raw material employed for PLA synthesis, the use of lignocellulosic biomass as carbon source is a promising alternative, since it constitutes a large scale byproduct in several industrial sectors. Among the available biomass substrates, the sugarcane bagasse represents an attractive candidate to feed PLA demands, since it constitute a cheap and abundant raw material in Brazil. In this context, the present work was delineated to study the lactic acid production from xylose, the main constituent of the hemicellulose fraction present in sugarcane bagasse. Our study explored the use of two distinct preparations of the biomass prior its use in the fermentative process: the bagasse wash water (MRS_{ALB}) and the bagasse hydrolyzate (MRS_{HBC}). For the bioconversion of interest, we selected 9 *Lactobacillus* strains ferment xylose were indentified for the acid production by screening tests for acidification on solid agar plates and fermentation assays in rotary incubator. *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 was the strain displaying the highest productivity, being selected for further studies. Fermentations using synthetic media (MRS) in the presence or absence of xylose revealed that *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 produces acetic acid from other carbon sources present in the media, such as peptone A, yeast extract and soy peptone. Results from batch fermentation in MRS_{ALB} media indicated that *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 fermented efficiently pentoses (xylose and arabinose) in the presence of glucose, reaching 2.37 g l⁻¹ of lactic acid and 0.99 g l⁻¹ of acetic acid, which represents a yield (Y_{P/S}) of 0.65 g/g and 0.27 g/g, respectively. This productivity was slightly minor than the observed for other lactic acid-producing strain, *Bacillus coagulans* 162, in similar fermentation conditions (Y_{P/S} = 0.85 g/g). Results from batch fermentation in MRS_{HBC} media revealed that glucose was the first sugar to be depleted, followed by xylose. In this fermentation conditions, *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 produced 28.99 g l⁻¹ of lactic acid, (Y_{P/S} = 0.78 g/g), whereas the acetic acid reached a final concentration of 8.19 g l⁻¹ (Y_{P/S} = 0.22 g/g). D(-)- lactic acid was produced isomeric form, representing 53-66% of total lactic acid synthesized by *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, which is important since it presents the ideal characteristics for PLA production. The highest xylose assimilation was observed when the peptone A was replaced by urea. In summary, our study confirm that, despite the hemicellulose fraction of sugarcane bagasse be more difficult to be assimilated than the cellulosic fraction, it can be considered an adequate raw material for the production of polylactic acid bioplastics, representing a low cost, renewable and abundant source of fermentable sugars. The strain *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 displayed a good fermentative performance, being considered a very attractive candidate for the biosynthesis of lactic acid from sugarcane bagasse.

Keywords: lactic acid, *Lactobacillus*, sugarcane bagasse, xylose, fermentation.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 3 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 3.1. ÁCIDO LÁTICO | 4 |
| 3.1.1. <i>Propriedades e obtenção</i> | 4 |
| 3.1.2. <i>Aplicações</i> | 12 |
| 3.2. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS | 20 |
| 3.2.1. <i>Produção de ácido lático a partir de materiais lignocelulósicos</i> | 28 |
| 3.3. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | 31 |
| 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL | 36 |
| 4.1. PLANO DE TRABALHO | 36 |
| 4.2. MATERIAIS | 36 |
| 4.2.1. <i>Matéria-prima</i> | 36 |
| 4.2.2. <i>Microrganismos</i> | 36 |
| 4.2.3. <i>Reagentes</i> | 37 |
| 4.3. METODOLOGIA | 39 |
| 4.3.1. <i>Determinação do teor de umidade (peso seco)</i> | 39 |
| 4.3.2. <i>Reativação dos microrganismos</i> | 40 |
| 4.3.3. <i>Manutenção da cultura</i> | 40 |
| 4.3.4. <i>Seleção de cepas capazes de produzir ácido a partir de xilose</i> | 41 |
| 4.3.5. <i>Capacidade de assimilação de xilose e determinação do comportamento cinético das cepas de Lactobacillus</i> | 42 |
| 4.3.6. <i>Fermentação em incubador rotativo pelo L. pentosus ATCC 8041</i> . | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.7. Fermentação em biorreator em modo batelada simples..... | 46 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041:..... | 46 |
| 4.3.8... Fermentação em incubador rotativo do meio <i>MRS_{xilose}</i> com variação da concentração de peptona A e substituição da peptona A por uréia pelo <i>L. pentosus</i> ATCC 8041..... | 49 |
| 4.3.9. Metodologia analítica..... | 51 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 5.1. CÁLCULO DO TEOR DE UMIDADE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATDO POR EXPLOSÃO A VAPOR | 55 |
| 5.2. SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS CAPAZES DE UTILIZAR XILOSE COMO FONTE DE CARBONO..... | 55 |
| 5.3. CAPACIDADE DE ASSIMILAÇÃO DE XILOSE E DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO CINÉTICO DAS CEPAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> | 57 |
| 5.4. FERMENTAÇÃO EM INCUBADOR ROTATIVO PELO <i>LACTOBACILLUS PENTOSUS</i> ATCC 8041 | 61 |
| 5.4.1. Meio <i>MRS</i> na ausência de xilose..... | 61 |
| 5.5. FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR EM MODO BATELADA SIMPLES | 63 |
| 5.5.1. Fermentação em batelada do meio <i>MRS_{xilose}</i> pelo <i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041..... | 63 |
| 5.5.2. Fermentação láctica do meio <i>MRS_{ALB}</i> | 65 |
| 5.5.3. Fermentação láctica do meio <i>MRS_{HBC}</i> | 71 |
| 5.6. FERMENTAÇÃO EM INCUBADOR ROTATIVO DO MEIO <i>MRS_{XILOSE}</i> COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A E SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A POR URÉIA..... | 77 |
| 5.6.1. Fermentação em meio <i>MRS_{xilose}</i> com variação da concentração de peptona A | 77 |
| 5.6.2. Fermentação em meio <i>MRS_{xilose}</i> com substituição da peptona A por uréia..... | 82 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 88 |
| 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 91 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 92 |

ÍNDICE DE FIGURA

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. ISÔMEROS DE ÁCIDO LÁTICO (ADAPTADO DE VIJAYAKUMAR <i>ET AL.</i> , 2008) (C*) - CARBONO ASSIMÉTRICO..... | 4 |
| FIGURA 2. SÍNTESE QUÍMICA DO ÁCIDO LÁTICO (ADAPTADO DE LI & CUI, 2010)..... | 6 |
| FIGURA 3. FERMENTAÇÃO MICROBIANA DO ÁCIDO LÁTICO (ADAPTADO DE LI & CUI, 2010). | 8 |
| FIGURA 4. ETAPAS BIOQUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO HOMOLÁTICA DE GLICOSE (ADAPTADO DE BUSTOS <i>ET AL.</i> , 2005)..... | 10 |
| FIGURA 5. ETAPAS BIOQUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO HETEROLÁTICA DE GLICOSE E PENTOSSES (XILOSE E ARABINOSE) (ADAPTADO DE RIVERA <i>ET AL.</i> , 2009; BUSTOS <i>ET AL.</i> , 2005)..... | 11 |
| FIGURA 6. TECNOLOGIAS E POTENCIAIS PRODUTOS A PARTIR DO ÁCIDO LÁTICO (ADAPTADO DE VIJAYAKUMAR <i>ET AL.</i> , 2008). | 14 |
| FIGURA 7. ESQUEMA DAS REAÇÕES PARA PRODUÇÃO DO PLA (ADAPTADO DE RASAL <i>ET AL.</i> ; 2010). | 16 |
| FIGURA 8. A CANA-DE-AÇÚCAR (FONTE: TRIANA <i>ET AL.</i> , 1990)..... | 22 |
| FIGURA 9. ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (ADAPTADO DE CANILHA <i>ET AL.</i> , 2009)..... | 24 |
| FIGURA 10. PRÉ-TRATAMENTO EM MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS SEGUIDA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (FONTE: CANILHA <i>ET AL.</i> , 2009)..... | 25 |
| FIGURA 11. EXPLOSÃO A VAPOR DA BIOMASSA (ADAPTADO DE RAMOS, 2003). | 27 |
| FIGURA 12. MEIOS DE CULTIVO MRS _{ALB} OU MRS _{HBC} | 39 |
| FIGURA 13. MEIO MRS _{ALB} PARA O <i>BACILLUS COAGULANS</i> 162..... | 39 |
| FIGURA 14. HIDROLISADO TOTAL (FRAÇÃO CELULÓSICA + FRAÇÃO HEMICELULÓSICA (ALB)). | 48 |
| FIGURA 15. TESTE DE ACIDIFICAÇÃO EM MEIO SÓLIDO COM XILOSE UTILIZANDO OS INDICADORES DE PH VERDE DE BROMOCRESOL E PÚRPURA DE BROMOCRESOL PARA AS ESPÉCIES DE <i>LACTOBACILLUS</i> ESTUDADAS..... | 56 |
| FIGURA 16. CINÉTICA DE CRESCIMENTO, CONSUMO DE SUBSTRATO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO PELO <i>L. PENTOSUS</i> ATCC 8041 DA FERMENTAÇÃO DO MEIO MRS _{XILOSE} . (▲) | |

| | |
|--|----|
| BIOMASSA, (◆) XILOSE, (X) ÁCIDO TOTAL (ACIDEZ TOTAL TITULÁVEL EM ÁCIDO LÁTICO). (CONDIÇÕES: 30°C, PH 6,0, 120H)..... | 60 |
| FIGURA 17. PERFIL DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO E ÁCIDO ACÉTICO EM MEIO MRS NA AUSÊNCIA DE XILOSE. (▲) BIOMASSA, (X) ÁCIDO LÁTICO, (Δ) ÁCIDO ACÉTICO. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 164H)..... | 62 |
| FIGURA 18. PERFIL DE CONSUMO DE XILOSE, CRESCIMENTO CELULAR EM PRODUÇÃO DE ÁCIDOS LÁTICO E ACÉTICO NA FERMENTAÇÃO EM BATELADA DO MEIO MRS _{XILOSE} . (▲) BIOMASSA, (◆) XILOSE, (X) ÁCIDO LÁTICO, (Δ) ÁCIDO ACÉTICO. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 72H)..... | 65 |
| FIGURA 19. CROMATOGRAMA DE GLICOSE, XILOSE E ARABINOSE PRESENTES NO MEIO MRS _{ALB} | 66 |
| FIGURA 20. (A) PERFIL DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS; (B) CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MEIO MRS _{ALB} PELO <i>L. PENTOSUS</i> ATCC 8041. (◆) XILOSE, (●) GLICOSE, (○) ARABINOSE, (■) AÇÚCAR TOTAL, (▲) BIOMASSA, (X) ÁCIDO LÁTICO, (Δ) ÁCIDO ACÉTICO. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 28H). | 68 |
| FIGURA 21. (A) PERFIL DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS E CINÉTICA DE CRESCIMENTO; (B) PRODUÇÃO DE ÁCIDO DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MEIO MRS _{ALB} PELO <i>BACILLUS COAGULANS</i> 162 (◆) XILOSE, (●) GLICOSE, (○) ARABINOSE, (▲) BIOMASSA, (X) ÁCIDO LÁTICO, (Δ) ÁCIDO ACÉTICO. (CONDIÇÕES: 52°C, 150 RPM, PH 6,0, 28H)..... | 70 |
| FIGURA 22. VIA PENTOSE-FOSFATO (ADAPTADO DE CHAMPE <i>ET AL.</i> , 2005). | 70 |
| FIGURA 23. CROMATOGRAMA DE GLICOSE, XILOSE E ARABINOSE PRESENTES NO MEIO MRS _{HBC} | 71 |
| FIGURA 24. (A) PERFIL DO CONSUMO DE CARBOIDRATOS; (B) CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MEIO MRS _{HBC} . (◆) XILOSE, (●) GLICOSE, (○) ARABINOSE, (■) AÇÚCAR TOTAL, (▲) BIOMASSA, (X) ÁCIDO LÁTICO, (Δ) ÁCIDO ACÉTICO. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 33H)... | 72 |
| FIGURA 25. CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS FORMADOS NA FERMENTAÇÃO DO MEIO MRS _{HBC} PELO <i>L. PENTOSUS</i> ATCC 8041..... | 74 |

- FIGURA 26. PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR DO *L. PENTOSUS* ATCC 8041 DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS_{XILOSE} COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A. (◆) 0 G/L, (■) 1 G/L, (▲) 2 G/L, (●) 3 G/L, (⌘) 4 G/L, (○) 5 G/L, (◇) 6 G/L, (□) 7 G/L, (Δ) 8 G/L. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 96H). 78
- FIGURA 27. CONSUMO DE XILOSE AO LONGO DO PERÍODO DE FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS_{XILOSE} COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A. (◆) 0 G/L, (■) 1 G/L, (▲) 2 G/L, (●) 3 G/L, (⌘) 4 G/L, (○) 5 G/L, (◇) 6 G/L, (□) 7 G/L, (Δ) 8 G/L. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 96H). 80
- FIGURA 28. PH DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS_{XILOSE} COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A. (◆) 0 G/L, (■) 1 G/L, (▲) 2 G/L, (●) 3 G/L, (⌘) 4 G/L, (○) 5 G/L, (◇) 6 G/L, (□) 7 G/L, (Δ) 8 G/L. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 96H). 82
- FIGURA 29. PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR DO *L. PENTOSUS* ATCC 8041 DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS_{XILOSE} COM SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A (P) POR URÉIA (U). (◆) 0 P + 2,74 U G/L, (■) 1 P + 2,4 U G/L, (▲) 2 P + 2,06 U G/L, (●) 3 P + 1,71 U G/L, (⌘) 4 P + 1,37 U G/L, (○) 5 P + 1,03 G/L, (◇) 6 P + 0,69 U G/L, (□) 7 P + 0,34 U G/L, (Δ) 8 P + 0 U G/L. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 96H). 83
- FIGURA 30. CONSUMO DE XILOSE AO LONGO DO PERÍODO DE FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS_{XILOSE} COM SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A POR URÉIA. (◆) 0 P + 2,74 U G/L, (■) 1 P + 2,4 U G/L, (▲) 2 P + 2,06 U G/L, (●) 3 P + 1,71 U G/L, (⌘) 4 P + 1,37 U G/L, (○) 5 P + 1,03 G/L, (◇) 6 P + 0,69 U G/L, (□) 7 P + 0,34 U G/L, (Δ) 8 P + 0 U G/L. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 96H). 85
- FIGURA 31. PH DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS_{XILOSE} COM SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A POR URÉIA. (◆) 0 P + 2,74 U G/L, (■) 1 P + 2,4 U G/L, (▲) 2 P + 2,06 U G/L, (●) 3 P + 1,71 U G/L, (⌘) 4 P + 1,37 U G/L, (○) 5 P + 1,03 G/L, (◇) 6 P + 0,69 U G/L, (□) 7 P + 0,34 U G/L, (Δ) 8 P + 0 U G/L. (CONDIÇÕES: 30°C, 150 RPM, PH 6,0, 96H). 87

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DO PLA, PHA E PHB. | 19 |
| TABELA 2. COMPOSIÇÃO MÉDIA DA CANA-DE-AÇÚCAR | 21 |
| TABELA 3. CONSTITUINTES DA CANA-DE-AÇÚCAR | 21 |
| TABELA 4. MICRORGANISMOS UTILIZADOS..... | 37 |
| TABELA 5. COMPOSIÇÃO DO MEIO MRS _{XILOSE} | 38 |
| TABELA 6. TEMPERATURA ÓTIMA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS. | 42 |
| TABELA 7. MEIO PROPOSTO POR OHARA (2007) PARA <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> | 43 |
| TABELA 8. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA DE ACORDO COM THOMAS (2000)..... | 43 |
| TABELA 9. DOSAGEM DE ENZIMAS RECOMENDADA PELA NOVOZYMES..... | 49 |
| TABELA 10. CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A E URÉIA NO MEIO MRS _{XILOSE} | 50 |
| TABELA 11. COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DO MÉTODO COLORIMÉTRICO SOMOGYI- NELSON..... | 52 |
| TABELA 12. PORCENTAGEM DE UMIDADE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR APÓS 24H DE SECAGEM..... | 55 |
| TABELA 13. PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DE XILOSE (20 G/L) EM FRASCOS..... | 58 |
| TABELA 14. PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR BACTÉRIAS LÁTICAS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. | 76 |
| TABELA 15. CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA OBTIDAS DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS CONTENDO XILOSE COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A..... | 79 |
| TABELA 16. CONCENTRAÇÕES DE XILOSE DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS _{XILOSE} COM VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A. | 81 |
| TABELA 17. CONCENTRAÇÕES DE BIOMASSA OBTIDAS DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS _{XILOSE} COM SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A POR URÉIA. | 84 |
| TABELA 18. CONCENTRAÇÕES DE XILOSE DURANTE A FERMENTAÇÃO EM MEIO MRS COM SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A POR URÉIA. | 86 |

NOMENCLATURA

| Símbolo | Nome |
|---------|---|
| AL | Ácido lático |
| LAB | Bactéria láctica |
| PLA | Polilactato |
| SSF | Sacarificação e fermentação simultânea. |
| ALB | Água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. |
| HBC | Hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. |

1. INTRODUÇÃO

O ácido lático tem uma posição privilegiada na família de ácidos carboxílicos devido às suas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêuticas, químicas e de cosméticos. A produção mundial de ácido lático está sendo impulsionada pela produção de polímeros biodegradáveis como o PLA (polilactato). Este ácido pode ser obtido por fermentação bacteriana ou síntese química, entretanto, desta obtém-se uma mistura racêmica de ácido lático enquanto o processo fermentativo permite a formação de ácido isomericamente puro. A busca pela sustentabilidade ambiental e desenvolvimento de fontes renováveis tem aumentado significativamente o interesse na produção de blocos construtores por via microbiana, como ácidos orgânicos, aditivos alimentares e insumos químicos industriais. Grande atenção tem sido dada ao potencial dos resíduos agroindustriais tais como o bagaço de mandioca, bagaço da cana, polpa de maçã, farelo de trigo/arroz, entre outros, para serem usados como matéria-prima na obtenção fermentativa de produtos de valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, etanol e aminoácidos, entre outros. (JOHN *et al.*, 2009; JOHN *et al.*, 2007; ADSUL *et al.*, 2006; JOHN *et al.*, 2006).

Materiais lignocelulósicos, como o bagaço da cana de açúcar (composto essencialmente por celulose, hemicelulose e lignina), representam um dos recursos renováveis nacionais mais abundantes que podem ser utilizados como matéria-prima para produtos químicos por processos fermentativos (ADSUL *et al.*, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2004; PANDEY *et al.*, 2000). O bagaço é o maior subproduto da indústria de cana-de-açúcar, constitui a fração de biomassa resultante após extração do caldo de cana, com composição média de 32-44% de celulose, 27-32% de hemicelulose, 19-24% de lignina e 4,5-9% de cinzas (SOCCOL *et al.*, 2010). Este material é, portanto, fonte importante de açúcares fermentescíveis utilizáveis como substrato em processos de fermentação microbiana (PANDEY *et al.*, 2000). No entanto, sua utilização depende de processos de tratamentos visando à extração e despolimerização do carboidrato. Pré-tratamentos (físicos ou químicos) seguidos de hidrólise (ácida ou enzimática)

do material pré-tratado e posterior fermentação dos açúcares para a obtenção do produto seriam as operações necessárias para a utilização do bagaço.

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de ácido lático é bastante atrativa não só pelo baixo custo, mas por não competirem diretamente com alimentos e por serem mais sustentáveis em termos de emissão de CO₂, e seu uso organizado pode reduzir o problema de descarte dos mesmos (CARA *et al.*, 2008; ADSUL *et al.*, 2006; LIN & TANAKA, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho é selecionar bactérias de bancos comerciais capazes de converter a xilose, principal constituinte da fração hemicelulósica presente no bagaço de cana-de-açúcar, em ácido lático e investigar a produção do mesmo a partir da água de lavagem (ALB) e hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (HBC) por bactérias lácticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar cepas de bactérias capazes de produzir ácido lático a partir de xilose;
- ✓ Estudar a capacidade de assimilação de xilose e determinar o comportamento cinético das cepas de *Lactobacillus*;
- ✓ Selecionar a cepa com potencial para sua utilização no processo, de acordo com os parâmetros cinéticos de fermentação;
- ✓ Determinar o comportamento cinético da cepa selecionada em meio sintético contendo xilose em biorreator;
- ✓ Investigar em biorreator a produção de ácido lático a partir do meio MRS_{ALB} (água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar) e meio MRS_{HBC} (hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar) pelo microrganismo selecionado;
- ✓ Determinar o isômero do ácido lático produzido;
- ✓ Verificar o efeito da substituição da peptona A por uréia no crescimento celular e consumo de xilose para produção de ácido pelo microrganismo selecionado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ÁCIDO LÁTICO

3.1.1. Propriedades e obtenção

O ácido lático, ácido 2-hidróxiopropiônico ou ácido α - hidróxiopropiônico, é o ácido carboxílico mais abundante na natureza. Foi descoberto pelo químico sueco Scheele em 1780 e sua produção comercial iniciou nos Estados Unidos por Charles E. Avery em 1881 (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; NARAYANAN *et al.*, 2004).

Trata-se de um ácido orgânico com um β -carbono assimétrico (centro quiral) que produz dois isômeros ópticos: L(+), D(-) e um DL racêmico que pode ser obtido através de síntese química (Figura 1), (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; LOPES, 2008; ADSUL *et al.*, 2006; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000;). O ácido lático é solúvel em água e solventes orgânicos miscíveis em água, mas é insolúvel em outros solventes apolares. Apresenta massa molar de 90,08, fórmula molecular: $C_3H_6O_3$, ponto de fusão de $16,8^\circ C$, constante de dissociação (K_a) de 3,86, densidade igual a 1,206 g/mL, calor específico (C_p a $20^\circ C$) de $190 J/mol^\circ C$, calor de combustão (ΔH_c) de 1361 KJ/mol (NARAYANAN *et al.*, 2004; LEHNINGER, 1995).

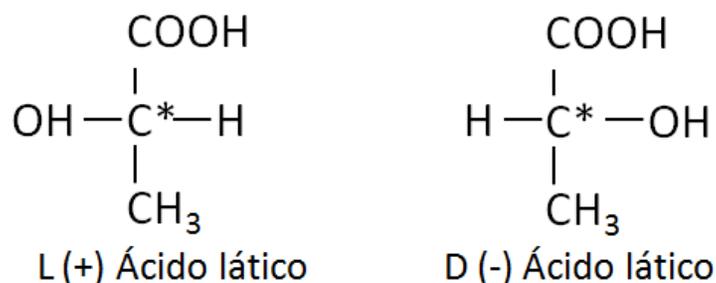


Figura 1. Isômeros de ácido lático (Adaptado de VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008) (C*)
- carbono assimétrico.

O ácido lático pode ser produzido por síntese química ou fermentação microbiana. Aproximadamente 90% do total de ácido lático mundial é feito por fermentação bacteriana e o restante é produzido sinteticamente pela hidrólise do lactonitrilo. A síntese química de ácido lático sempre resulta numa mistura racêmica (DL - ácido lático), sendo esta sua maior desvantagem. A produção biotecnológica de ácido lático oferece também outras vantagens comparadas com a síntese química, tais como o baixo custo de substratos (carboidratos renováveis), menores temperaturas de processo, menor consumo de energia e a possibilidade da obtenção de D- ou L- ácido lático opticamente puro ou uma mistura em diferentes proporções dos dois isômeros; dependendo da cepa microbiana selecionada, substrato e condições de crescimento utilizadas (DUMBREPATIL *et al.*, 2008; GIVRY *et al.* 2008; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; JOHN *et al.*, 2007; ADSUL *et al.*, 2006; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

Para a síntese química do ácido lático (Figura 2), ácido cianídrico e acetaldeído reagem na presença de uma base sob altas pressões para produzir o lactonitrilo. A destilação é usada para purificar este lactonitrilo bruto. O lactonitrilo purificado é, então, hidrolisado com ácido sulfúrico para produzir o ácido lático. Sais de amônio também são produzidos como subproduto (LI & CUI, 2010; NARAYANAN *et al.*, 2004).

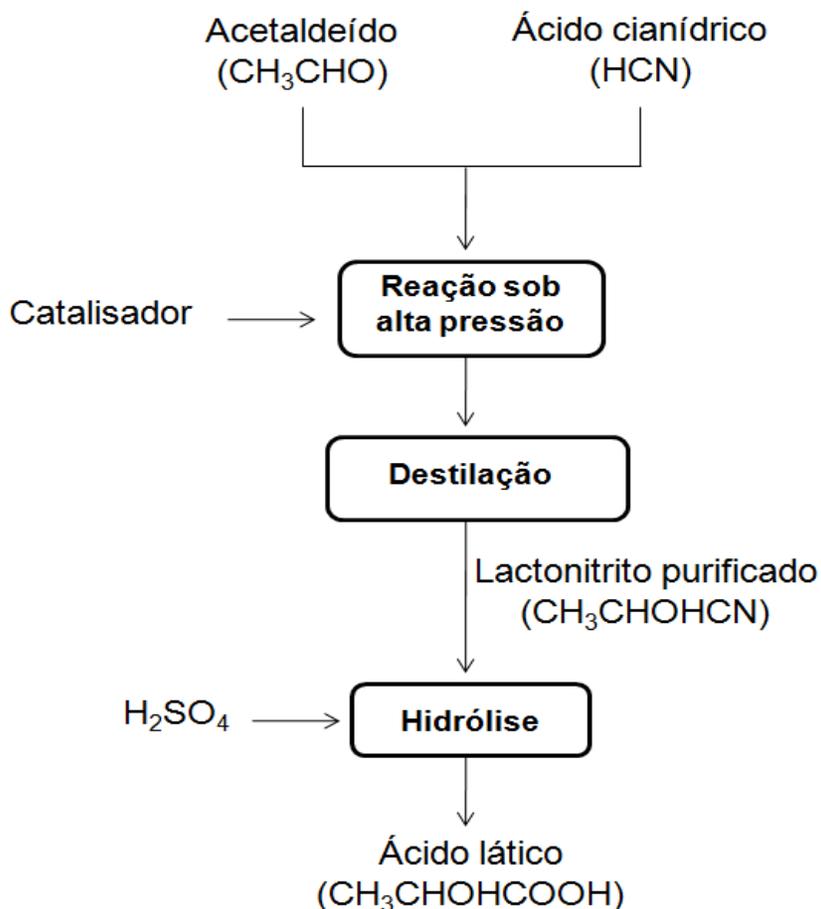


Figura 2. Síntese química do ácido lático (Adaptado de LI & CUI, 2010).

O ácido lático pode ser obtido pela fermentação de uma grande variedade de matérias-primas, subprodutos ou resíduos industriais, tais como: glicose, sacarose, lactose (açúcares purificados), soro de leite, melão de cana-de-açúcar, mandioca, batata, cevada, farelo de trigo e de arroz, resíduos da fabricação de queijo, resíduos de polpa de banana e de abacaxi, milho, amido de milho, resíduos que contenham carboidratos complexos como o amido, celulose e hemicelulose, que podem ser utilizados como fonte de substratos (LITCHFIELD, 2009). A produção fermentativa do ácido lático (Figura 3) pode ser realizada por bactérias, leveduras e fungos, incluindo também as formas geneticamente modificadas destes microrganismos. Porém, as bactérias lácticas (LAB) são comumente empregadas na fermentação de carboidratos para sua obtenção e este é o foco da

maioria dos estudos da produção de ácido lático (LITCHFIELD, 2009; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

Quando o soro de queijo ou açúcares simples são usados, como a lactose, glicose ou sacarose podem ser fermentados diretamente em ácido lático (Figura 3, rota 3). A biomassa amilácea pode ser hidrolisada à glicose pela liquefação e sacarificação enzimática e então, fermentada para produzir ácido lático (Figura 3, rota 2). Biomassa amilácea também pode ser diretamente fermentada a ácido lático pela bactéria láctica amilolítica. Quando a biomassa lignocelulósica é usada, um processo de pré-tratamento é necessário para romper as ligações entre a celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e hemicelulose são hidrolisadas pelas celulasas e hemicelulasas em açúcares fermentescíveis que podem ser fermentados a ácido lático por microrganismos (Figura 3, rota 1). A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) também podem ser utilizadas simultaneamente num único reator. Quando o ácido lático é obtido via processos microbianos é necessário realizar a sua separação e purificação (LI & CUI, 2010).

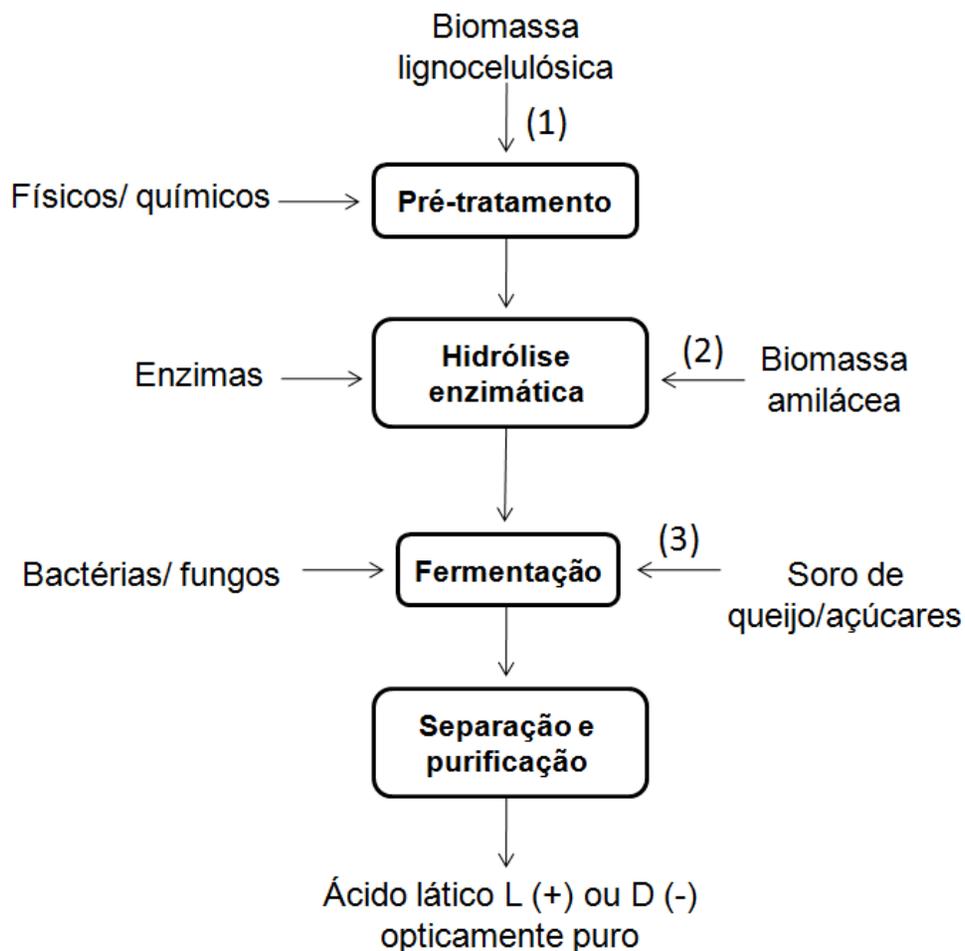


Figura 3. Fermentação microbiana do ácido lático (Adaptado de LI & CUI, 2010).

3.1.1.1. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas podem ter forma de cocos ou bacilos, ocorrem em cadeia ou isoladamente, são Gram-positivas, não apresentam motilidade, não formam esporos, são catalase negativa, são anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, não patogênicas sendo consideradas GRAS (Generally Recognized as Safe) e incapazes de sintetizar ATP pela respiração (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; TANAKA *et al.*, 2002; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

Além da capacidade em produzir ácido lático, as LAB podem também contribuir para outras características de produtos como sabor, textura e nutrição. Sem dúvida, a aplicação mais importante das LAB é na indústria de laticínios, embora sejam também aplicadas em escala industrial de outras matérias-primas alimentares como carne, vegetais e vinhos e nas indústrias química e farmacêutica (BUSTOS *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2002; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

As bactérias lácticas requerem nutrientes complexos para seu crescimento e manutenção tais, como carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e sais, devido à sua habilidade limitada em sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos (LITCHFIELD, 2009; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; ADSUL *et al.*, 2006; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000). Essas bactérias obtêm energia através da fermentação de açúcares e os produtos finais do metabolismo são: lactato, acetato, etanol, CO₂ e ácido fórmico. A temperatura ótima de crescimento é em média de 30°C dependendo do gênero, são acidófilas e altamente tolerantes à acidez, sobrevivendo em valores de pH 5,0 ou inferiores. Estas bactérias são encontradas naturalmente em ambientes rico em nutrientes como leite, carne e derivados, vinho, vegetais, frutas, sucos de frutas, pickles e no corpo humano e de animais (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

As LAB podem fermentar a glicose em ácido lático por vias diferentes podendo ser divididas em dois grupos: homofermentativo e heterofermentativo, de acordo com o produto final obtido (LUIS TÉLLEZ *et al.*, 2003; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000). Na homofermentação, o ácido lático é o único produto final obtido do metabolismo de glicose que segue a via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) ou via glicolítica (Figura 4). Por outro lado, no metabolismo heterofermentativo, quantidades equimolares de ácido lático, CO₂, e etanol ou acetato são formados a partir de glicose e pentoses (xilose e arabinose) usando a via fosfoquetolase (PK) (Figura 5). Esta proporção de etanol e acetato formado depende do potencial redox do sistema. Esta via é usada pelas bactérias heterofermentadoras facultativas, como é o caso do *Lactobacillus casei*, para a fermentação de pentoses, e para a fermentação de hexoses e pentoses por

heterofermentadoras obrigatórias, como por exemplo, o *Leuconostoc* (BUSTOS *et al.*, 2005; HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

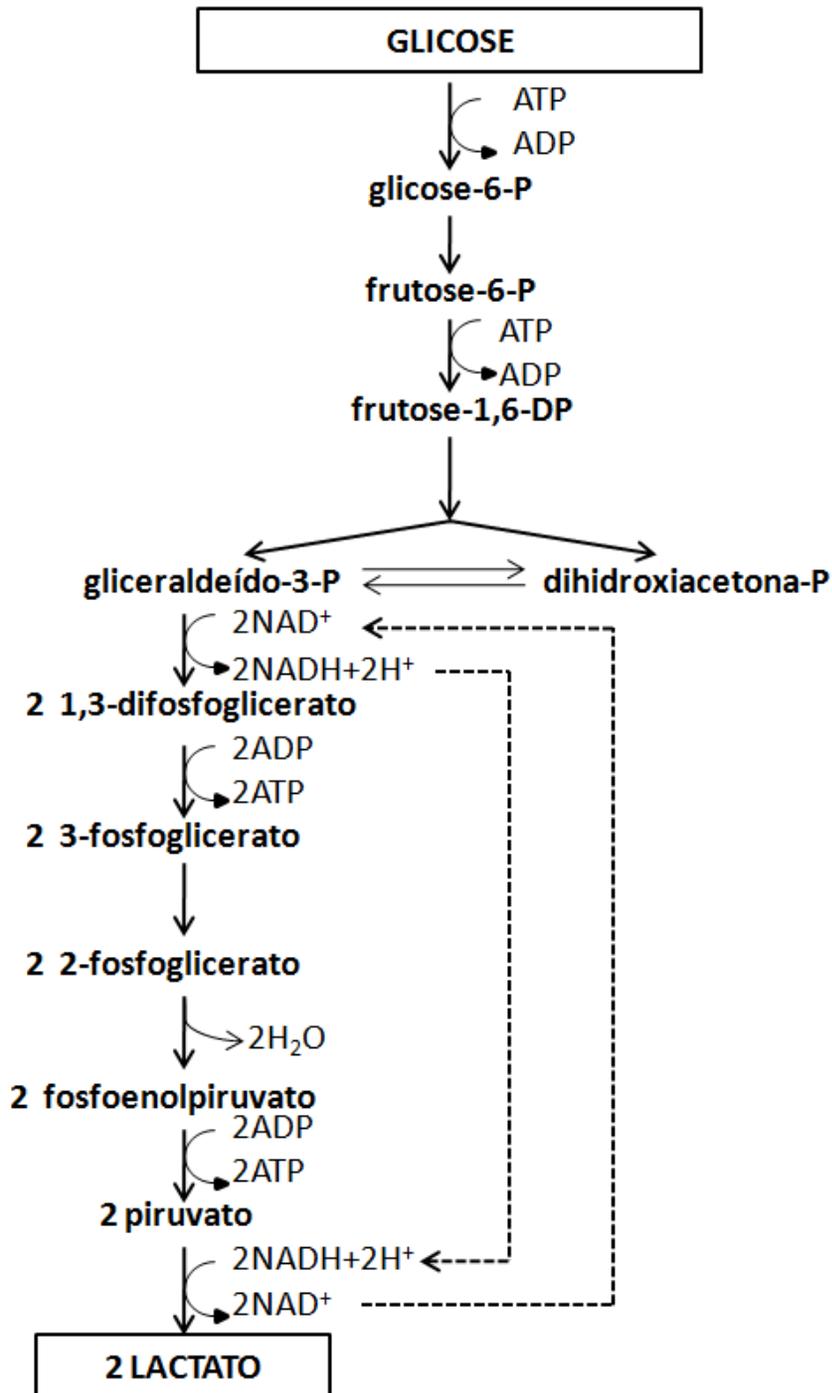


Figura 4. Etapas bioquímicas durante a fermentação homolática de glicose (Adaptado de BUSTOS *et al.*, 2005).

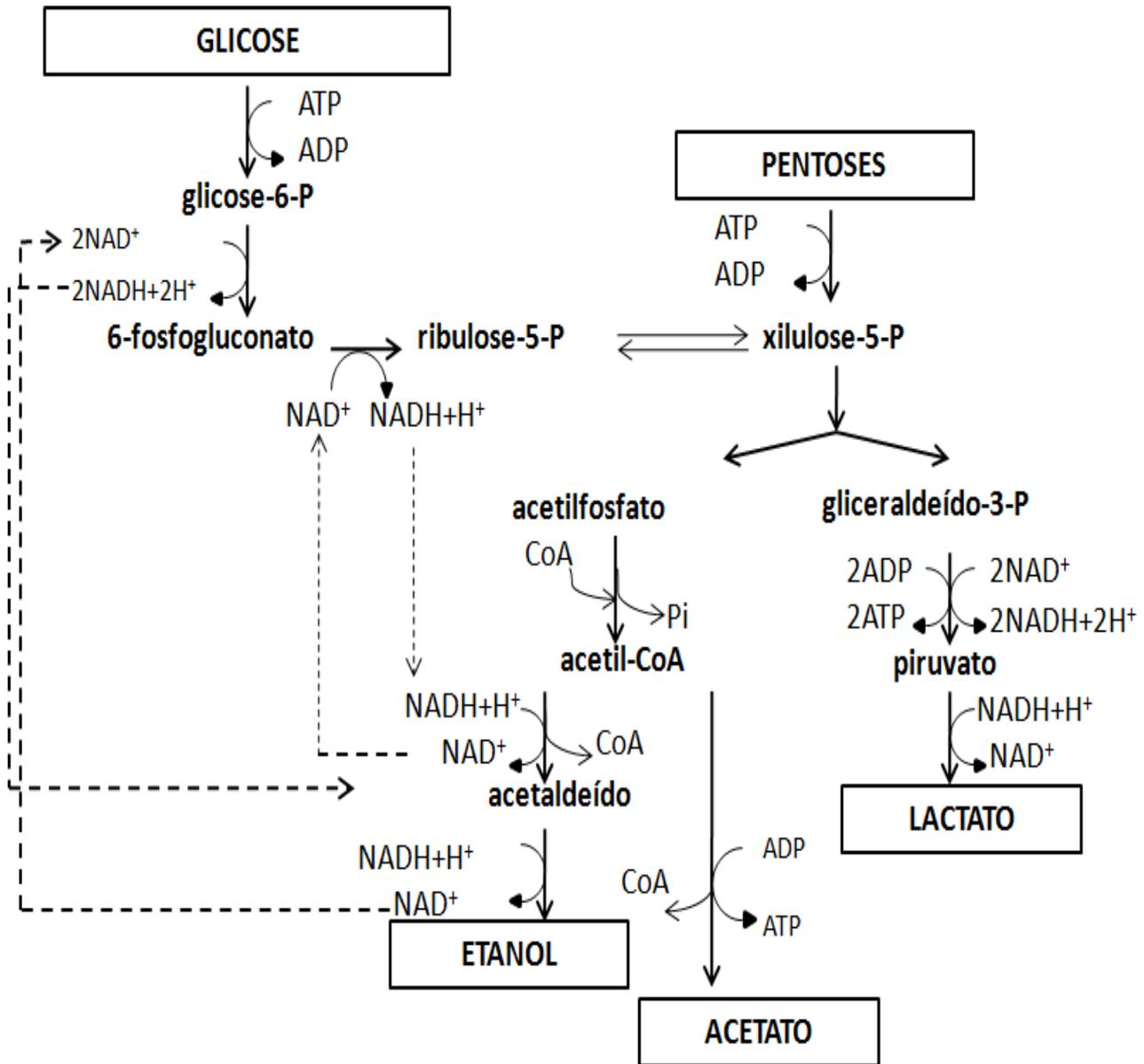


Figura 5. Etapas bioquímicas durante a fermentação heterolática de glicose e pentoses (xilose e arabinose) (Adaptado de RIVERA *et al.*, 2009; BUSTOS *et al.*, 2005).

Além do ácido láctico, outros ácidos podem ser formados por microrganismos homofermentadores mesmo que em pequenas quantidades. No entanto, a produção de ácido láctico é muito superior quando comparado aos outros compostos como o etanol, acetato e formiato. Dentre esses homofermentadores podemos citar o *Lactococcus*, que em condições limitadas de glicose e durante o crescimento em outros açúcares, por exemplo, o *Lactococcus lactis* em maltose, lactose e galactose, ou ainda em pH alto e baixa temperatura pode formar vários ácidos (HOFVENDAHL & HÄGERDAL, 2000).

As bactérias homofermentativas são de grande interesse comercial para a produção de ácido láctico devido a razões econômicas como a fermentação de glicose e sacarose em ácido láctico através da via Embden-Meyerhof, com conversão teórica de 1 mol de glicose em 2 mols de ácido láctico. Dentre as cepas homofermentativas podemos citar: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylophilus*, entre outros. Algumas cepas de bactérias lácticas heterofermentativas convertem pentoses, como xilose e arabinose, obtidos da hidrólise de resíduos hemicelulósicos em ácido láctico através da via pentose fosfatoquetolase. Os rendimentos de ácido láctico obtidos da fermentação de xilose por cepas heterofermentativas são de no máximo 0,6 g de ácido láctico por g de xilose devido à formação de outros compostos, principalmente o ácido acético. As cepas *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* estão entre as bactérias heterofermentativas fermentadoras de xilose (LITCHFIELD, 2009; LOPES, 2008; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

3.1.2. Aplicações

3.1.2.1. Indústria de alimentos, química e farmacêutica

O ácido láctico possui uma longa história de usos para a fermentação e preservação de alimentos humanos (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008). É um produto químico versátil amplamente utilizado em indústrias alimentícias, farmacêuticas,

cosméticas, químicas e têxteis. Sua maior aplicação é de seus derivados é efetuada na indústria de alimentos como acidulante, flavorizante, agente antimicrobiano, estabilizador, umectante, emulsificador e plastificante (LITCHFIELD, 2009; GIVRY *et al.*, 2008; XU *et al.* 2007; ADSUL *et al.*, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2004; BUSTOS *et al.*, 2004; HAULY *et al.* 2003; XIAODONG *et al.*, 1997). Ao contrário de outros aditivos ácidos para alimentos, este possui um leve sabor ácido. É não-volátil, inodoro e é classificado como GRAS (Generally Recognized As Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) nos EUA. Nos EUA a aplicação em alimentos conta com aproximadamente 85% da demanda e o restante (15%) é aplicado em indústrias não-alimentícias (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

Entre as aplicações industriais observa-se seu uso para ajustes de pH durante o processo de produção de cerveja (maceração e cozimento do mosto), promovendo melhora na estabilidade microbiana e sabor da cerveja. O ácido lático também é amplamente usado como acidulante em refrigerantes levemente saborizados e sucos de frutas, com a vantagem de não mascarar ou sobrepor o sabor natural. Por estas razões o ácido lático é preferido em relação ao ácido cítrico (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

Azeitonas verdes, repolho e maxixe são freqüentemente embalados numa solução de sal, ácido lático e água, onde o ácido lático atua como conservante e melhora a turbidez da salmoura e o sabor. Uma mistura de ácido acético e ácido lático em produtos como pepinos em conserva (pickles) confere aroma e sabor mais suaves e melhora a estabilidade microbiana (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

O ácido lático também é amplamente utilizado em carnes e seus derivados como agente antimicrobiano. A descontaminação de carnes, aves e carcaças suínas em matadouro é realizada utilizando ácido lático para reduzir a infecção por *Salmonella* e alguns estudos indicam que o uso de spray de ácido lático quente em carcaças pode reduzir até 99% a contaminação por *E. coli* (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; BUSTOS *et. al.*, 2007, NARAYANAN *et al.*, 2004).

Embora seja usado principalmente como hidratantes e reguladores de pH, o ácido lático possui outras propriedades como atividade antimicrobiana,

clareamento e hidratação da pele e os ésteres de ácido lático com alcoóis alifáticos de cadeia longa são usados como emulsificantes, construtores e estabilizadores em produtos de higiene pessoal. (LITCHFIELD, 2009; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

Na indústria química o ácido lático é usado no curtimento e acabamento têxtil como, por exemplo, o tingimento da seda, na descalcificação de vegetais, como modificador e removedor de resinas e polímeros, neutralizador, agente regulador de pH, solvente e ainda pode sofrer uma variedade de conversões químicas em substâncias químicas potencialmente úteis, como o óxido de propileno (via hidrogenação), acetaldeído (via descarboxilação), ácido acrílico (via desidratação), dilactídio (via auto-esterificação), ácido propanóico (via redução) (Figura 6) LITCHFIELD, 2009; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

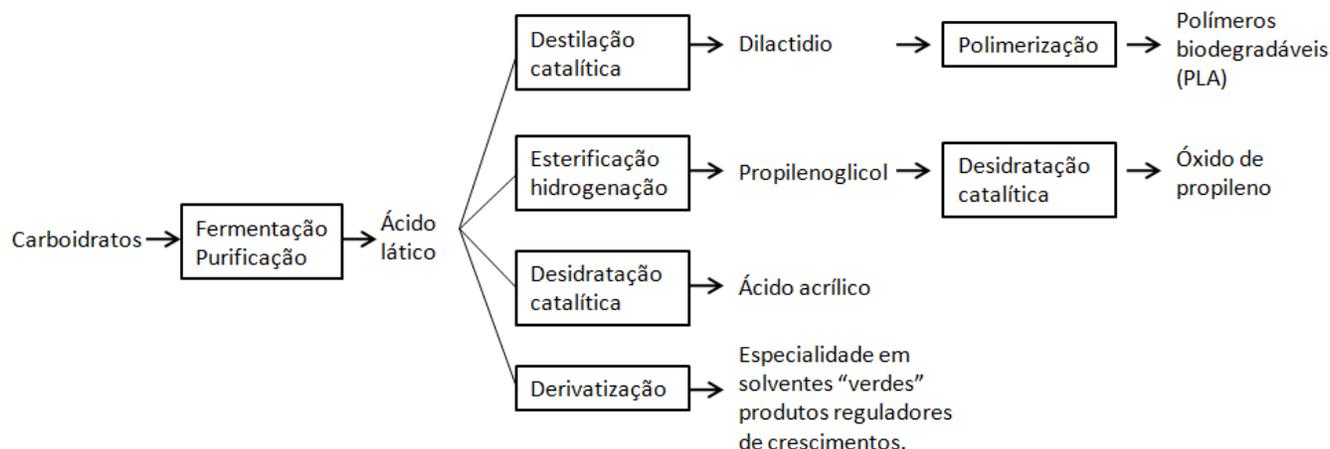


Figura 6. Tecnologias e potenciais produtos a partir do ácido lático (Adaptado de VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008).

3.1.2.2. Polilactato (PLA)

O ácido lático tem recebido grande atenção como matéria-prima para a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis, como o polilactato (PLA)

(KARP *et al.*, 2011; LI & CUI, 2010; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2008; ADSUL *et al.*, 2006; KADAM *et al.*, 2006; ROJAN *et al.*, 2005). A atual demanda mundial de ácido lático é estimada em 130. 000 – 150. 000 toneladas por ano (LI & CUI, 2010) mas estima-se que até o fim de 2011 seja em torno de 200.000 toneladas por ano principalmente como um resultado do crescente mercado para o PLA (KARP *et al.*, 2011). O PLA é um poliéster alifático, produzido via polimerização de ácido lático que pode ser obtido pela condensação direta utilizando solventes sob alto vácuo. Alternativamente, num processo isento de solventes, um dímero cíclico intermediário chamado lactídeo é formado, seguido da polimerização catalítica de abertura do anel do lactídeo cíclico (Figura 7). A produção comercial do PLA é realizada geralmente pela polimerização de abertura do anel do lactídeo, já que a policondensação direta gera somente polímeros de baixo peso molecular, principalmente devido à presença de água e impurezas. Normalmente o PLA de baixa massa molar é desprovido de propriedades mecânicas e por isso necessita a remoção do solvente, uso de solventes sob alto vácuo e alta temperatura, e além dessas, há outras desvantagens no processamento de policondensação direta, como o aumento da cor e racemização do polímero (RASAL *et al.*, 2010).

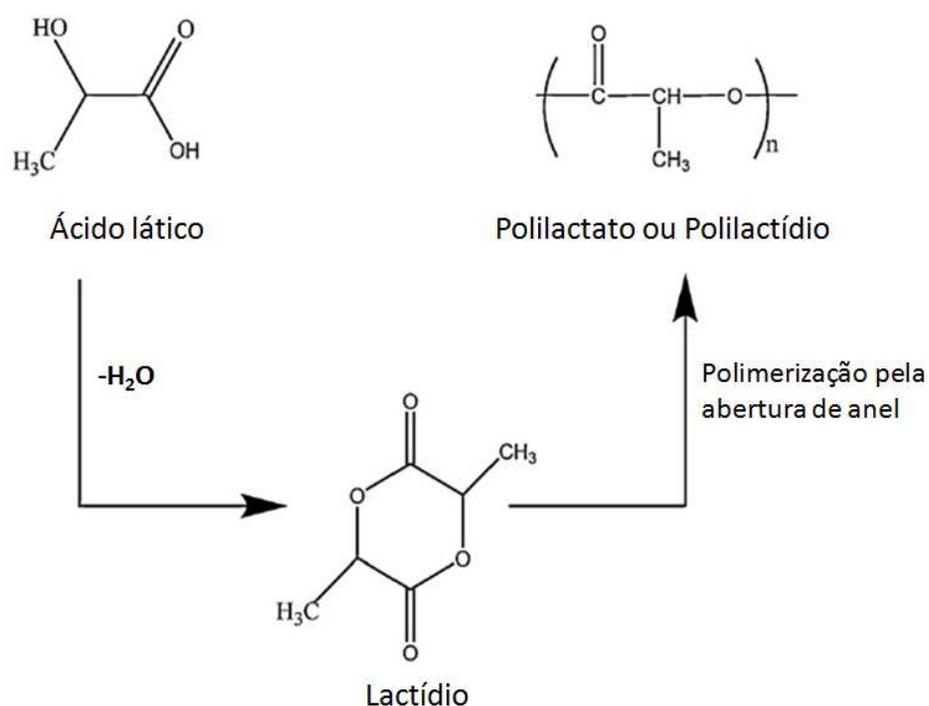


Figura 7. Esquema das reações para produção do PLA (Adaptado de RASAL *et al.*; 2010).

O PLA é considerado um polímero biodegradável no ambiente e biocompatível em contato com tecidos vivos, podendo ter aplicações biomédicas (EUBELER *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2010, WU, 2009; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2008; ONYARI, *et al.*, 2008; ADSUL *et al.*, 2006; HOFVENDAHL & HÄHN-HÄGERDAL, 2000). A produção específica dos isômeros de ácido lático, D- ou L-ácido lático, pode ser obtida pelo uso adequado da cepa de *Lactobacillus* (SHEN *et al.*, 2010). A produção de PLA requer ácido lático de alta pureza óptica e química, pois as propriedades físicas e biológicas dos polímeros de ácido lático estão relacionadas com a pureza enantiomérica dos estereocopolímeros de ácido lático (NEUREITER *et al.*, 2004). A polimerização de L-ácido lático resulta em PLLA (L- polilático) e polimerização de D-ácido lático resulta em PDLA (D- polilático). A maioria do PLA comercial é poli (meso-ácido lático), que é uma mistura de L- ácido lático (> 95%) e D- ácido lático (< 5%) (SHEN *et al.*, 2009). Como um biopoliéster, o PLA pode desempenhar um papel relevante no que se

refere às questões de problemas ambientais. Ou seja, o PLA poderia ser um substituto de plásticos produzidos de derivados do petróleo (KARP *et al.*, 2011; VODNAR *et al.*, 2010; TANIGUCHI *et al.*, 2004). Considerando a ampla gama de aplicações do PLA podemos citar as embalagens (ex. copos, garrafas e filmes), têxteis (ex. camisetas e revestimentos para móveis), fraldas descartáveis e talheres (SHEN *et al.*, 2010; LITCHFIELD, 2009).

O PLA é um bioplástico biodegradável, reciclável, bioabsorvível e compostável, transparente, com excelente biocompatibilidade, processabilidade térmica e menor dependência energética (KARP *et al.*, 2011; RASAL *et al.*, 2010). O PLA pode se decompor em condições ambientais sob o ataque microbiano, como bactérias e fungos. A degradação do PLA se dá através da hidrólise de grupos de ésteres e a taxa de degradação depende da cristalinidade do PLA, massa molar e sua distribuição, morfologia, taxa de difusão da água no polímero, conteúdo estereoisomérico (PLA amorfo quando o conteúdo de D- isômero é alto e PLA cristalino quando o conteúdo de D-isômero é muito baixo), tempo, temperatura e umidade. Os principais produtos da degradação são o ácido carbônico (H_2CO_3) e água. A duração da degradação do PLA no meio ambiente pode variar de 12 meses a mais de 2 anos, em oposição aos plásticos convencionais, como o poliestireno (PS) e polietileno (PE), que necessitam de centenas ou até mesmo milhares de anos para se degradar. A taxa de degradação é freqüentemente considerada um importante critério de seleção para aplicações biomédicas e também constitui um sério problema com respeito ao descarte dos produtos de consumo (RASAL *et al.*, 2010; PAPAGEORGIU *et al.*, 2010; EUBELER *et al.*, 2010; WU, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2008; GARLOTTA, 2002).

ONYARI *et al.*, (2008) estudaram a biodegradabilidade de filmes de PLA usando bactérias termofílicas que apresentaram rápida taxa de degradação e demonstraram dependência da temperatura. A biodegradação do PLA foi demonstrada pela diminuição da massa molar. A biodegradabilidade do PLA sob diferentes condições ambientais foi reportada por RUDEEKIT *et al.*, (2008), sendo realizados testes em águas residuárias, aterro e condições reais e controladas de

compostagem. A variação do tempo de degradação pôde ser atribuída às condições ambientais, sendo observado que a folha de PLA se degrada completamente em condições reais e controladas de compostagem, enquanto que a degradação em aterros naturais e em tratamento de águas residuárias necessitaria de um tempo maior.

Além do PLA como polímero biodegradável, pode-se destacar o Polihidroxialcanoato (PHA) (Tabela 1). Os PHA's são polímeros biosintetizados (por bactéria) com propriedades similares aos plásticos convencionais, porém são completamente biodegradados a CO₂ e H₂O. O polímero de PHB, que é o principal representante da família dos PHA's, é muito importante porque possui boas propriedades materiais assim como biodegradabilidade (WENG *et al.*, 2011; EUBELER *et al.*, 2010; SABIR *et al.*, 2009; BONARTSEV *et al.*, 2007; PHILIP *et al.*, 2007; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

Apesar de suas vantagens o PLA também possui algumas desvantagens que limitam seu uso em certas aplicações, entre as quais podemos citar a baixa tenacidade, lenta taxa de degradação, hidrofobicidade relativa, estabilidade térmica inferior aos polímeros convencionais e falta de grupos reativos de cadeia lateral (Tabela 1) (RASAL *et al.*, 2010; PAPAGEORGIOU *et al.*, 2010; EUBELER *et al.*, 2010; WU, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; GARLOTTA, 2002). O PLA ainda não é amplamente utilizado devido ao seu alto custo como, por exemplo, na aplicação em embalagens, e propriedades térmicas e mecânicas inferiores em relação aos polímeros sintéticos convencionais (RASAL *et al.*, 2010; KIMURA, 2009; LI *et al.*, 2009; WU, 2009). No entanto, com o aumento das preocupações ambientais e sustentáveis associados aos polímeros petroquímicos convencionais, as aplicações do PLA continuarão a aumentar. Contudo, algumas modificações no PLA têm sido amplamente utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas (principalmente resistência), estabilidade térmica, comportamento de degradação, processabilidade e cristalinidade visando aumentar sua aplicabilidade. A mistura com diferentes plastificantes e polímeros (biodegradável e não-biodegradável) é provavelmente a metodologia mais usada para melhorar as propriedades mecânicas do PLA (RASAL *et al.*; 2010).

Tabela 1. Características e aplicações do PLA, PHA e PHB.

| Biopolímero | Vantagens | Desvantagens | Comercializados | Aplicações | Referências |
|----------------------------|---|--|--------------------------------|---|--|
| PLA (polilactato) | Biodegradável, biocompatível, bioabsorvível, transparente, compostável, processabilidade térmica, menor dependência energética, boa resistência mecânica | Baixa tenacidade, lenta taxa de degradação, hidrofobicidade relativa, propriedades térmica e mecânica inferiores aos polímeros convencionais, alto custo | Sim | Biomédica, farmacêutica, embalagens (copos, filmes, alimentos), fraldas biodegradáveis, talheres, produtos de higiene pessoal, sacos para resíduos, ambientais, | KARP <i>et al.</i> , 2011; PAPAGEORGIOU <i>et al.</i> , 2010; RASAL <i>et al.</i> , 2010; LI & CUI, 2010; EUBELER <i>et al.</i> 2010; LI <i>et al.</i> , 2009; LITCHFIELD, 2009; SATYANARAYANA <i>et al.</i> , 2009; SHEN <i>et al.</i> , 2009; KIMURA, 2009; WU, 2009; ZHANG <i>et al.</i> , 2009; ONYARI <i>et al.</i> , 2008; VIJAYAKUMAR <i>et al.</i> , 2008; REDDY <i>et al.</i> , 2008; RUDEEKIT <i>et al.</i> , 2008; ZHANG <i>et al.</i> , 2008; ADSUL <i>et al.</i> , 2006; KADAM <i>et al.</i> , 2006; ROJAN <i>et al.</i> , 2005; GARLOTTA, 2002; HOFVENDAHL & HÄHN-HÄGERDAL, 2000 |
| PHA (polihidroxialcanoato) | Biodegradável, propriedades termoplásticas e elastoméricas, reciclável, biocompatível, propriedade de barreira a gás, natureza piezoelétrica, propriedades mecânicas, | Rigidez, quebradiço, cristalinidade, disponibilidade restrita, extração do PHA | Sim | Garrafas plásticas para alimentos e bebidas, cobertura de papel ou papelão (como superfície resistente à água), médica, embalagens flexíveis, fabricação de pentes e canetas, papel sintético, dispositivos médicos, fones de ouvidos, auto-falantes, embalagens descartáveis; agricultura; biomaterial | WENG <i>et al.</i> , 2011; EUBELER <i>et al.</i> , HASSAN <i>et al.</i> , 2010; 2010; SABIR <i>et al.</i> , 2009; PHILIP <i>et al.</i> , 2007; WANG <i>et al.</i> , 2010; BONARTSEV <i>et al.</i> , 2007; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006; WILLIAMS <i>et al.</i> , 1999 |
| PHB (polihidroxibutirato) | Biodegradável, boa propriedade material, propriedades físicas ajustáveis, biocompatível, termoplástico | Frágil, alta rigidez, processabilidade, alta cristalinidade, quebradiço | Sim (Nome comercial: Biocycle) | Farmacêutica, médica, produtos agrícolas, odontológica, biomaterial | WENG <i>et al.</i> , 2011; EUBELER <i>et al.</i> , 2010; OTARI & GHOSH, 2009; SATYANARAYANA <i>et al.</i> , 2009; RASAL <i>et al.</i> , 2010; BONARTSEV <i>et al.</i> , 2007 |

3.2. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Avanços nos processos industriais trouxeram oportunidades para utilização de resíduos agroindustriais (materiais lignocelulósicos) tais como o bagaço da cana-de-açúcar, resíduos de papel, hidrolisados de madeira, bagaço de uva, farelo de casca de cevada, poda de vinhedos, sabugo de milho, *Eucalyptus globulus*, bastante disponíveis que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de um grande número de produtos químicos como o etanol e o ácido lático por processos fermentativos (RIVERA *et al.*, 2009; ADSUL *et al.*, 2006; MOLDES *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2000; IYER *et al.*, 2000).

O uso de uma fonte específica de carboidrato depende de seu preço, disponibilidade e pureza (JOHN *et al.*, 2009). No caso do ácido lático, um dos principais obstáculos para a sua produção em grande escala é o custo da matéria-prima, que se torna muito elevado quando açúcares purificados (glicose e sacarose) são utilizados como matéria-prima. A fim de reduzi-lo, uma alternativa seria a utilização de resíduos agroindustriais beneficiando a redução dos problemas ambientais causados pelo acúmulo daqueles (JOHN *et al.*, 2006).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma planta da origem das gramíneas muito cultivada nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a planta é a principal matéria-prima para a produção de açúcar, etanol e outros subprodutos. Desde a sua origem até os dias atuais, a cana-de-açúcar vem passando por modificações que resultou em várias espécies, as quais se diferem entre si pelo conteúdo de açúcares e fibras. Hoje, a cana cultivada é um híbrido da planta original com outras espécies da mesma família. Sua composição química é apresentada na Tabela 2 e os seus principais constituintes estão indicados na Tabela 3. Entre as substâncias encontradas na cana-de-açúcar, a mais importante é a sacarose, que é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose (PUPULIN, 2010; RABELO, 2007; LANZOTTI, 2000).

Tabela 2. Composição média da cana-de-açúcar

| Composição | Teor (%) |
|-------------------|-----------------|
| Água | 65 - 75 |
| Açúcares | 11 - 18 |
| Fibras | 8 - 14 |
| Sólidos solúveis | 12 - 23 |

Fonte: Coopersucar, 1988.

Tabela 3. Constituintes da cana-de-açúcar

| Constituintes | Sólidos solúveis (%) |
|----------------------|-----------------------------|
| Açúcares: | 75 - 93 |
| - Sacarose | 70 - 91 |
| - Glicose | 2,0 - 4,0 |
| - Frutose | 2,0 - 4,0 |
| Sais: | 3,0 - 5,0 |
| - Ácidos orgânicos | 1,5 - 4,5 |
| - Ácidos inorgânicos | 1,0 - 3,0 |
| Proteínas | 0,5 - 0,6 |
| Amido | 0,001 - 0,05 |
| Canas | 0,3 - 0,6 |
| Ceras e graxas | 0,05 - 0,15 |
| Corantes | 3 |

Fonte: Coopersucar, 1988.

Como a maior parte das plantas, a cana-de-açúcar dispõe de um eixo principal, denominado talo, de onde emergem as raízes, as folhas e as inflorescências (Figura 8). Dos constituintes da cana-de-açúcar, o talo é a parte mais importante, constituindo o fruto agrícola da mesma, pois apresenta valor econômico devido a sua capacidade de armazenar açúcares e produzir fibras (MIRANDA, 2009; RABELO, 2007).

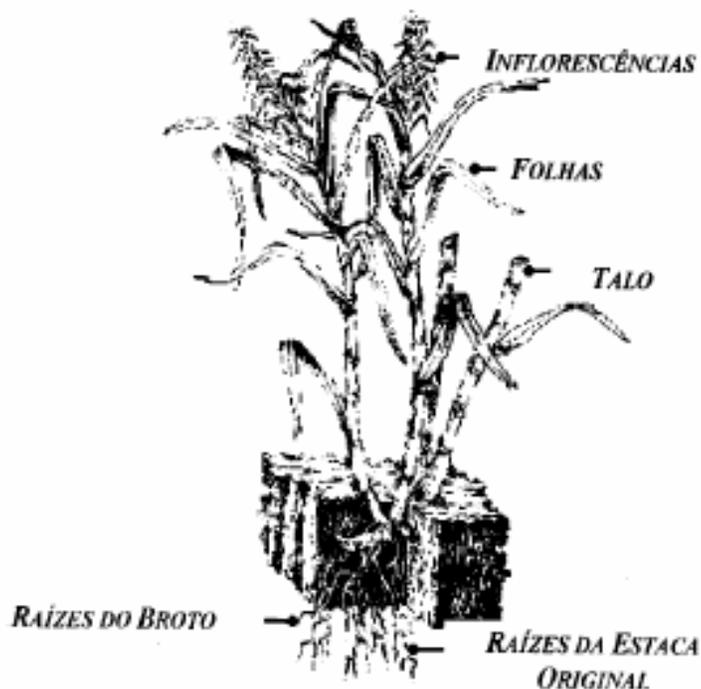


Figura 8. A cana-de-açúcar (Fonte: TRIANA *et al.*, 1990)

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, conferindo proteção contra os efeitos mecânicos externos e servindo de suporte para a planta. A medula, tecido parenquimatoso de caráter não fibroso, encontra-se no interior do talo e tem como principal função o armazenamento do suco adocicado produzido pela planta. No interior deste tecido encontram-se as hastes fibrovasculares (feixes vasculares), compostas de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução de água, alimentos e outros produtos ao longo da planta (SUGARCANECROPS, 2011; MIRANDA, 2009; RABELO, 2007).

A biomassa lignocelulósica é composta de celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes (Figura 9) (TANIGUCHI *et al.*, 2004; PANDEY *et al.*, 2000; FENGEL E WEGENER, 1989). Estes constituintes podem ser identificados em diferentes quantidades

percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento (FENGEL E WEGENER, 1989).

A celulose, constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, proporcionando uma cadeia linear macromolecular de elevada massa molar, alto grau de polimerização (podendo atingir até 10.000), considerável grau de cristalinidade, insolúvel em água e estrutura rígida (CANILHA *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2008, RABELO, 2007).

A hemicelulose é um polímero heterogêneo que está intimamente associado à celulose na parede da célula vegetal, sendo composto por pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose), ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. É ramificada, apresenta um grau de polimerização inferior a 200 e pode ser acetilada (CANILHA *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2008). As madeiras moles (coníferas) apresentam maior proporção de galactoglicomananas do que de xilanas, enquanto que as madeiras duras (folhosas) não apresentam xilanas como seus principais constituintes hemicelulósicos. O teor de hemicelulose em diferentes tipos de vegetais é bastante variável, com um valor médio de 20%. Quando sofre hidrólise a hemicelulose pode ser decomposta em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural. A xilose é o principal açúcar encontrado na hemicelulose do bagaço (CANILHA *et al.*, 2009; RABELO, 2007).

A lignina é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. Constitui a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose e representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo apoio estrutural, impermeabilização, resistência à degradação química e/ ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose (KUMAR *et al.*, 2009; CANILHA *et al.*, 2009; RABELO, 2007).

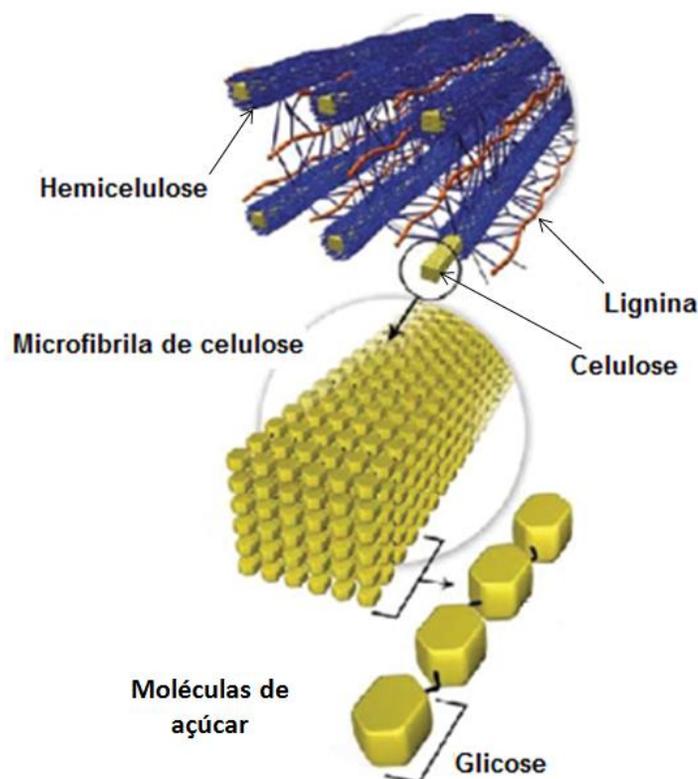


Figura 9. Estrutura da biomassa lignocelulósica (Adaptado de CANILHA *et al.*, 2009).

A biomassa lignocelulósica, em geral, é resistente à bioconversão, pois seus açúcares encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) associados entre si e recobertos por uma macromolécula aromática complexa (lignina), formando a microfibrila celulósica que constitui a parede celular vegetal difícil de ser desestruturada (Figura 9). Para sua utilização como substrato em processos microbianos é preciso transformar as cadeias poliméricas de carboidratos em açúcares que possam ser assimilados, essencialmente glicose, xilose e arabinose (e outros açúcares encontrados em menores concentrações no hidrolisado, como galactose e manose). Este processo de transformação requer inicialmente um pré-tratamento da biomassa (físico, químico, físico-químico ou biológico), seguido de hidrólise (ácida ou enzimática). O pré-tratamento tem a finalidade de remover ou alterar a lignina para aumentar a acessibilidade da

biomassa às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (Figura 10), sendo também durante esta etapa que a maior parte da hemicelulose é removida. Este processo deve ser o mais simples possível para obtenção de um produto com viabilidade comercial (CANILHA *et al.*, 2009; TAHERZADEH & KARIMI 2008; JOHN *et al.*, 2007; ADSUL *et al.*, 2006; WEE *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2000).

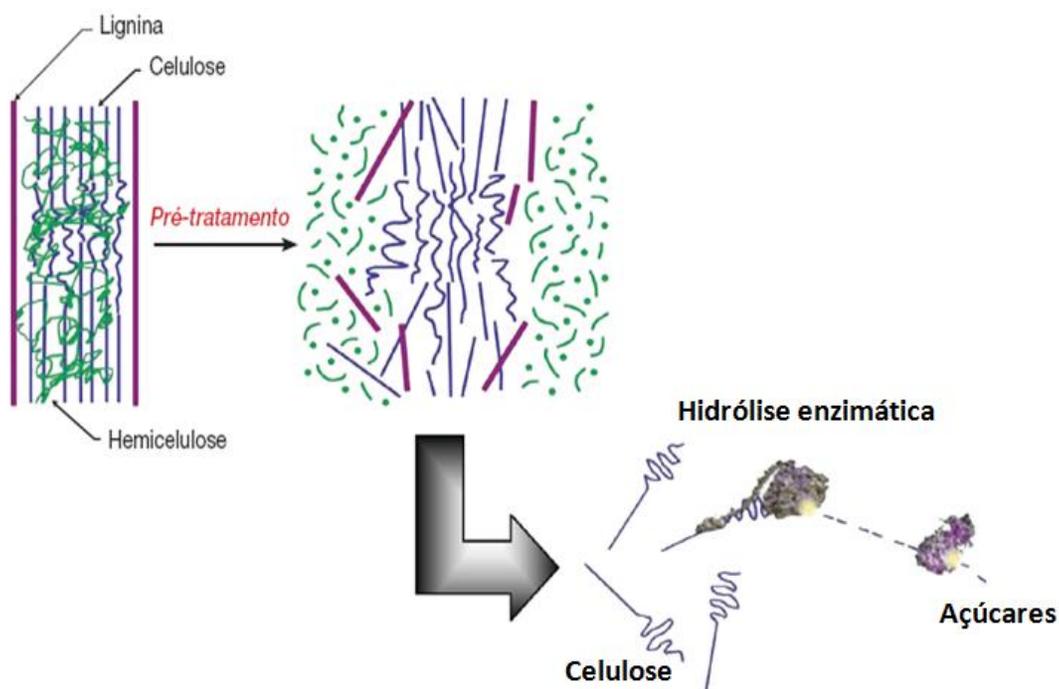


Figura 10. Pré-tratamento em materiais lignocelulósicos seguida de hidrólise enzimática (Fonte: CANILHA *et al.*, 2009).

Existem diferentes tipos de pré-tratamentos entre os quais, inclui a explosão a vapor, radiação gama, tratamento ácido ou alcalino, amônia, uréia, peróxido de hidrogênio, solventes, trituração física ou moagem, degradação por fungos ou a combinação destes. As melhores opções de pré-tratamento são aquelas que combinam elementos de ambos os métodos físicos e químicos. Todos os métodos têm o objetivo de aumentar a susceptibilidade da associação celulose-lignina e assim melhorar a hidrólise enzimática (KUMAR *et al.*, 2009; HEERAH *et al.*, 2008; RAMOS, 2003; PANDEY *et al.*, 2000).

O pré-tratamento por explosão a vapor (ou steam explosion) envolve o tratamento térmico da biomassa com vapor saturado a alta pressão e, em seguida, a rápida descompressão provoca a expansão das fibrilas de celulose, causando o rompimento físico, a ruptura das cadeias de glicose e a remoção simultânea da lignina (STAVRINIDRES, 2010; CORTEZ *et al.*, 2008). A biomassa é exposta a uma temperatura de 160 a 260°C com uma pressão correspondente de 0,69 a 4,83 MPa por vários segundos a poucos minutos antes do material ser exposto à pressão atmosférica para resfriamento. A alta pressão de vapor modifica radicalmente a estrutura da parede celular vegetal produzindo um material marrom escuro (licor negro) a partir do qual a hemicelulose parcialmente hidrolisada pode ser facilmente recuperada pela água de lavagem, deixando uma fração insolúvel em água composta por celulose, hemicelulose residual e lignina quimicamente modificada (Figura 11) que pode continuar a ser extraída por álcali fraco, dioxano, etanol ou agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio alcalino e cloreto de sódio (KUMAR *et al.*, 2009; CORTEZ *et al.*, 2008; TAHERZADEH & KARIMI 2008; HEERAH *et al.*, 2008; TAHERZADEH & KARIMI 2007; RAMOS, 2003). O processo de explosão a vapor causa a degradação da hemicelulose e transformação da lignina, devido à alta temperatura e assim, aumenta o potencial de hidrólise da celulose. As vantagens do pré-tratamento por explosão a vapor incluem a baixa energia gasta em comparação com a moagem mecânica e a não reciclagem ou custos ambientais (KUMAR *et al.*, 2009; TAHERZADEH & KARIMI 2008; SUN & CHENG, 2002). Além disso, a explosão a vapor permite a obtenção de materiais com menor densidade de fibras, melhores propriedades de resistência, alta estabilidade térmica e menor absorção de umidade, dependendo da química e da distribuição do componente lignina nas fibras tratadas com vapor (BRUGNAGO *et al.*, 2011).

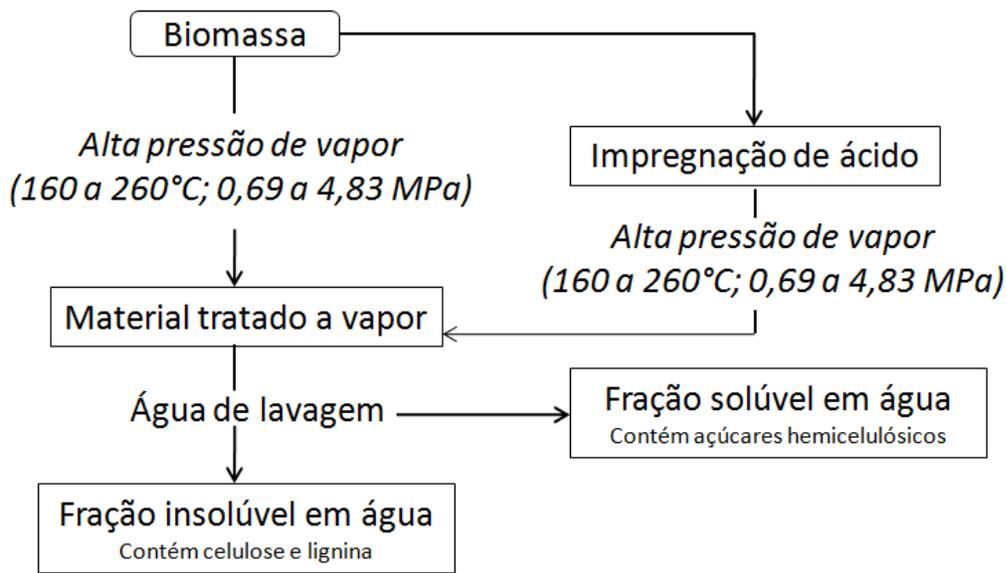


Figura 11. Explosão a vapor da biomassa (Adaptado de RAMOS, 2003).

Na hidrólise ácida, faz-se uso de ácidos como, por exemplo, o ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) para catalisar a reação de hidrólise de materiais lignocelulósicos (LAOPAIBOON *et al.*, 2010). Embora a hidrólise ácida da biomassa seja eficiente e relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior (RABELO, 2007). Os custos da hidrólise enzimática são baixos quando comparados com a hidrólise ácida, porque a hidrólise enzimática é geralmente realizada em condições brandas (pH 4,8 e temperatura entre 45-50°C) e não acarretando corrosão dos equipamentos (SUN & CHENG, 2002).

A celulose é hidrolisada pelas enzimas celulasas (geralmente uma mistura de várias enzimas) altamente específicas em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de produtos indesejáveis na reação, diminuindo assim, os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamentos de efluentes. No caso da hidrólise enzimática, a especificidade da enzima evita ainda que ocorra a degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (RABELO, 2007). Pelo menos, os três maiores grupos de celulasas estão envolvidos no processo de hidrólise: (1) endoglucanase (EG, endo-1,4-D-

glucanohidrolase) que ataca as regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica criando cadeias de radicais livres; (2) exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolase) que degrada a molécula pela remoção das unidades de celobiose das cadeias de radicais livres; (3) β -glicosidase que hidrolisa a celobiose para produzir glicose. Durante a hidrólise enzimática, a celulose é degradada pelas celulasas em açúcares redutores que podem ser fermentados por microrganismos para obtenção do produto desejado (CORTEZ *et al.*, 2008; SUN & CHENG, 2002).

3.2.1. Produção de ácido lático a partir de materiais lignocelulósicos

A maioria dos estudos sobre a produção de ácido lático a partir de materiais lignocelulósicos utiliza somente a fração celulósica, porque há poucos microrganismos capazes de fermentar açúcares hemicelulósicos (pentoses) (BUSTOS *et al.*, 2007; RIVERA *et al.*, 2007; MOLDES *et al.*, 2006; HOFVENDAHL & HÄHN-HÄGERDAL, 2000). Espécies de *Lactobacillus* capazes de fermentar hexoses, microrganismos mais utilizados na produção de ácido lático, são geralmente incapazes de utilizar pentoses como fonte carbono, por isso um grande número de estudos foram realizados em busca de novas cepas, bem como por engenharia genética, que possam utilizar hexoses e pentoses eficientemente (BUSTOS *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2007).

IYER *et al.*, (2000) estudaram a fermentação de pentoses para a produção de ácido lático utilizando hidrolisado de madeira (hidrólise ácida) pelo *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* (ATCC 10863). Quando exposta a um meio sintético com diferentes concentrações iniciais de xilose, esta cepa apresentou uma fase lag inicial de 24-72h. Foi observado que a fase lag aumentou com o aumento da concentração inicial de xilose, de 1% a 8% (p/v) e atingiu um rendimento de ácido lático de 0,80 a 0,83 g/g, dependendo da concentração de xilose. Já quando exposto a uma mistura de xilose e glicose, a glicose foi consumida preferencialmente e somente depois de sua completa exaustão o consumo de xilose foi iniciado. O período de fase LAG foi observado somente no

início da primeira etapa de utilização de xilose e não foi observado nas etapas subsequentes de alimentação entre glicose e xilose. Quando submetida a uma mistura de açúcares encontrados em menor quantidade na biomassa lignocelulósica (galactose, manose, arabinose), esta cepa utilizou primeiramente glicose e então manose, seguida pela utilização simultânea de xilose e galactose, enquanto que a arabinose não foi consumida. Experimentos em batelada alimentada foram realizados para avaliar a inibição pelo produto na fermentação de xilose, onde o grau de inibição foi tal que a produtividade diminuiu de um nível inicial de 0,37 para somente 0,13 g/(L.h) num ponto em que a concentração de ácido lático foi de 70 g/L. Na fermentação em batelada utilizando o hidrolisado de madeira com adição externa de 15 g/L de glicose, 5 g/L de xilose, 5 g/L de manose, 2,5 g/L de galactose e 1,5 g/L de arabinose foi obtida uma concentração máxima de 23,75 g/L de ácido lático em 108h de cultivo. A utilização de hidrolisado de madeira com adição externa de açúcares apresentou rendimentos de ácido lático próximos dos açúcares puros, porém a uma taxa mais lenta.

MOLDES *et al.*, (2006) mostraram que a utilização de açúcares fermentescíveis de resíduos agroindustriais hemicelulósicos, como xilose e arabinose, pelo *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 apresentou excelentes resultados em termos de produtividade e rendimento de ácido lático independentemente da quantidade de glicose presente no meio. Os hidrolisados (hidrólise ácida) de poda de vinhedos, farelo da casca de cevada, sabugo de milho e *Eucalyptus globulus* (desintoxicado com carvão ativado) foram utilizados como fonte de carbono. A concentração máxima de ácido lático (33 g/L) e produtividade volumétrica (0,60 g/(L.h)) foram alcançadas empregando o hidrolisado de farelo de cevada. O rendimento máximo em relação à utilização de pentoses (0,76 g/g) foi alcançado utilizando hidrolisado de poda de vinhedos, seguido por hidrolisado de *Eucalyptus globulus* desintoxicado (0,70 g/g), farelo de cevada (0,57 g/g) e sabugo de milho (0,53 g/g). Estes resultados mostraram que o *L. pentosus* pode ser utilizado para fermentar açúcares hemicelulósicos (principalmente xilose, glicose e arabinose) de hidrolisados da maioria dos resíduos agroindustriais.

THOMAS (2000) investigou o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) do hidrolisado de resíduo sólido de celulose para a produção de ácido lático pelo *Lactobacillus delbrueckii* (NRRL B-445). Os experimentos SSF foram realizados em vários níveis de pH, temperatura e concentrações de nutrientes, e as condições de cultivo de pH 5,0 e 45°C resultaram em uma concentração final de 14 g/L de ácido lático, onde o consumo de xilose iniciou após o consumo total de glicose alcançando um rendimento de 83%. O consumo simultâneo de xilose e glicose foi descrito nos experimentos SSF em pH 5,5 e 45°C e em pH 5,0 e 47°C, com a produção de 17 g/L (rendimento de 93%) e 15 g/L de ácido lático (rendimento de 97%), respectivamente. A capacidade de fermentação deste microrganismo foi também investigada usando somente xilose como fonte de carbono e uma mistura de glicose e xilose em duas fontes de nitrogênio, o extrato de levedura e a triptona. A fermentação de xilose e glicose em pH 5,5 e 45°C em meio contendo extrato de levedura resultou na produção de 18 g/L de ácido lático e um rendimento de 0,86 g/g de açúcar consumido. Já, no mesmo meio, a fermentação de xilose em concentrações de 13 g/L e 27 g/L, ambas em pH 5,0 e 45°C, resultou em concentrações de 11 g/L e 25 g/L de ácido lático e rendimentos de 88% e 93%, respectivamente.

O *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 foi isolado e identificado por LIU *et al.*, (2008), cujo trabalho apresenta uma produção de 40 – 83 g/L de ácido lático a partir de xilose com rendimento de 60%, em processos em batelada e batelada alimentada. Esta cepa é robusta, tolerante a etanol e capaz de utilizar diversas fontes de carbono, como a xilose, apresentando potencial de aplicações na plataforma de biorrefinaria, podendo ganhar grande atenção na produção de ácido lático.

ADSUL *et al.*, (2006) estudaram a conversão do bagaço da cana em ácido lático pela sacarificação e fermentação simultânea (SSF) em batelada, usando uma preparação de celulase derivada de um mutante de *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 (Mutante EU1) e utilizando o mutante de *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 (Mutante Uc-3 gerado pela exposição à irradiação UV) como produtor de ácido lático. O SSF em batelada resultou numa concentração de 67 g/L de

ácido lático com um rendimento de 0,83 g/g de bagaço e produtividade de 0,93 g/[L.h]. O mutante de *L. delbrueckii* Uc-3 foi capaz de utilizar a celobiose (um forte inibidor de celulases), produzindo ácido lático com alto rendimento (0,9 g ácido lático/ g celobiose).

Como exemplos de microrganismos fermentadores de xilose para a produção de ácido lático, além dos citados acima, temos o *Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus plantarum*, e o *Lactococcus lactis* (THOMAS, 2000), além do microrganismo recombinante, como o *Lactobacillus* MONT4 (pLP3537-xyI) que apresentou alto rendimento de ácido lático (94%) a partir de xilose (PICATAGGIO *et al.*, 1998).

3.3. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, sendo responsável por aproximadamente 20% da produção e 40% das exportações de açúcar, seguido da Austrália e Índia (UNICA, 2011; MAPA, 2011; LAOPAIBOON *et al.*, 2010; PESSOA-JR *et al.*, 2005). É também o primeiro do mundo na produção de açúcar e ocupa a segunda posição como produtor mundial de etanol, atrás apenas dos Estados Unidos que utilizam o milho como matéria-prima para a produção de etanol (RFA, 2011; UNICA, 2011). O Brasil conquista cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. Na safra de 2008/09 foram processados cerca de 569 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo que cerca de 90% do total na principal região produtora do País, a Centro-Sul que engloba as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e 10% no Nordeste. No Brasil, a área cultivada com cana-de-açúcar atingiu cerca de 7 milhões de hectares em 2007, e deve dobrar até 2020, elevando a produção anual para um bilhão de toneladas, ou mais do que o dobro dos 480 milhões de toneladas processados na safra 2007/08. Este crescimento é esperado devido à crescente demanda interna de produção de etanol, assim como à perspectiva de ampliação das exportações do mesmo nos próximos anos. Após 2020, estima-se que a produção de cana-de-açúcar continue a aumentar em função das novas

tecnologias, incluindo o desenvolvimento de novas variedades de cana, ganho de produtividade, e a chegada do etanol de segunda geração, ou etanol celulósico, que permitirá o uso do bagaço e da palha em sua produção podendo ampliar a produção por tonelada de cana em até 37 litros (UNICA, 2011; MAPA, 2011).

Um importante subproduto lignocelulósico agroindustrial é o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), resíduo fibroso dos colmos da cana remanescente após o esmagamento e extração do caldo da cana-de-açúcar. As usinas de açúcar geram aproximadamente 270 – 280 kg de bagaço (50% de umidade) por tonelada de cana-de-açúcar, representando cerca de 30% do total produzido. No Brasil, a produção anual de bagaço de cana-de-açúcar é atualmente estimada em 186 milhões de toneladas (SOCCOL *et al.*, 2010), o qual é principalmente utilizado na geração de vapor e eletricidade necessária às plantas de processamento de açúcar e etanol; sendo, tradicionalmente, queimado em caldeiras de baixa eficiência para produzir quantidades modestas de energia e limitar o problema de sua eliminação. Uma parte do excedente de bagaço é utilizada também na fabricação de papelão, ração animal (CARDONA *et al.*, 2010; SOCCOL *et al.*, 2010; MIRANDA, 2009; PIPPO *et al.*, 2008; WRIGHT, 2006; BAUDEL *et al.*, 2005; PESSOA-JR *et al.*, 2005; MARTÍN *et al.*, 2002). No entanto, o bagaço remanescente é geralmente estocado, constituindo um problema ambiental devido ao risco de combustão espontânea do bagaço armazenado, e ao mesmo tempo constitui uma fonte de recurso renovável (BAUDEL *et al.*, 2005; PESSOA-JR *et al.*, 2005; MARTÍN *et al.*, 2002). Além disso, com o aumento na produção da cana em resposta ao crescimento global da demanda de etanol, (de 66 para 125 m³/ton cana-de-açúcar entre 2008 e 2020), mais bagaço estará disponível (BETANCUR, 2010). CORTEZ, (2010) afirma que já em 2012 a produção de cana de açúcar deve chegar a 730 milhões de toneladas, podendo superar 1 bilhão de toneladas em 10 anos.

Entre as várias fontes potenciais de biomassa, o bagaço de cana tem sido um dos resíduos industriais mais promissores. É composto de celulose (32-44%), hemicelulose (27-32%), lignina (19-24%) e cinzas (4,5-9%) (SOCCOL *et al.*, 2010). Quimicamente, o bagaço contém cerca de 50% de α - celulose, 30% de

pentosanas e 2,4% de cinzas. Devido ao seu baixo conteúdo de cinzas, o bagaço apresenta numerosas vantagens em comparação a outros resíduos de colheita, tais como palha de arroz e de trigo que apresentam teores de cinzas de 17,5% e 11%, respectivamente, para uso em processos de bioconversão utilizando culturas microbianas (PANDEY *et al.*, 2000). Devido ao seu alto conteúdo de carboidrato (celulose e hemicelulose), relativo baixo conteúdo de lignina e sua disponibilidade como produto de resíduo industrial (baixo custo) e contribuinte para a redução da poluição ambiental, o bagaço é particularmente um substrato apropriado para a bioconversão em etanol (etanol de segunda geração), ácido lático, ácido glutâmico, alcalóides, enzimas, cogumelos e matéria-prima para a produção de alimentação animal enriquecida com proteína, aumentando assim a economia do processo (LAOPAIBOON *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2009; ROJAN *et al.*, 2005, MARTÍN *et al.*, 2002; PANDEY *et al.*, 2000). A xilana, depois da glucana, é o carboidrato mais abundante no bagaço. A xilose pode ser responsável por quase 1/3 do conteúdo total de açúcares no hidrolisado do bagaço. Portanto, microrganismos capazes de fermentar glicose e xilose são necessários para uma conversão eficiente de bagaço em produtos de interesse (MARTÍN *et al.*, 2002).

Assim como os materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana necessita de pré-tratamento visando melhorar sua digestibilidade e facilitar o acesso ao ataque microbiano. O pré-tratamento tem por finalidades alterar ou remover a hemicelulose e/ou a lignina, aumentar a área superficial (porosidade do material) e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, o que acarreta em aumento na digestibilidade enzimática facilitando a hidrólise enzimática subsequente e, conseqüentemente, no rendimento em açúcares fermentescíveis (Figura B9). Vários métodos físicos e químicos são empregados para o pré-tratamento que incluem a explosão a vapor, radiação gama, tratamento com álcali, peróxido de hidrogênio, solventes e entre outros (KIM *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2009; CANILHA *et al.*, 2009; CORTEZ *et al.*, 2008;; PANDEY *et al.*, 2000).

Vários processos e produtos que utilizam o bagaço de cana como matéria-prima têm sido relatados, incluindo a geração de calor e eletricidade, produção de papel e celulose e produtos obtidos através da biotecnologia (baseados em

fermentação) (RATTANACHOMSRI et al., 2011; PANDEY et al., 2000). A bioconversão do bagaço de cana para uma grande variedade de produtos de valor agregado por processos microbianos também são relatados, incluindo alimentos ricos em proteínas, enzimas, biocombustíveis e produtos químicos, como o ácido lático (RATTANACHOMSRI et al., 2011).

O bagaço de cana-de-açúcar oferece possibilidades de valorização integral transformando-o em commodities com potencial de mercado nacional e internacional (CONTRERAS et al., 2009). No Brasil, várias tecnologias têm sido desenvolvidas para a produção comercial de produtos a partir do bagaço, como a fibra natural que pode ser utilizada em tubulação de saneamento, reservatórios, piscinas, canos e estações de tratamento de água e esgoto (PESSOA-JR et al., 2005). O bagaço da cana também tem sido empregado na área de biotecnologia como suporte inerte para a produção de ácido lático pelo *Rhizopus orizae* e *Lactobacillus casei* em fermentação sólida pela suplementação de açúcares ou hidrolisado de amido como fonte de carbono (ROJAN et al., 2005; SOCCOL et al., 1994). Por outro lado, ADSUL et al. (2006) relatam também a utilização do bagaço da cana como matéria-prima para a produção de ácido lático por um mutante de *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 pelo processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF). Há uma série de processos envolvendo a utilização do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de produtos como a penicilina, pectinases, ácido lático e etanol como, por exemplo, a fermentação submersa, fermentação sólida e sacarificação e fermentação simultânea (SSF) (PELIZER et al., 2007; PANDEY et al., 2000).

A aplicação do bagaço de cana-de-açúcar em bioprocessos não fornece somente substratos alternativos, mas também ajuda a solucionar os problemas de sua eliminação; trazendo consigo inovações tecnológicas, principalmente na área de enzimas e tecnologia de fermentação, promovendo a abertura de novos caminhos que possibilitam sua correta utilização e obtenção de produtos de valor agregado (ADSUL et al., 2006). Assim, o bagaço de cana não pode ser encarado somente como um combustível (gerando vapor e energia elétrica), mas também como um substrato abundante que possui um potencial muito elevado para a

fabricação de diversos produtos com altos valores comerciais (PESSOA-JR *et al.*, 2005).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1. PLANO DE TRABALHO

Este plano de trabalho descreve as principais etapas realizadas neste projeto.

- Seleção dos microrganismos fermentadores de xilose;
- Capacidade de assimilação de xilose, determinação do comportamento cinético das cepas de *Lactobacillus* e seleção da cepa com maior capacidade de fermentação da pentose;
- Fermentação em incubador rotativo do meio MRS na ausência de xilose pelo microrganismo selecionado;
- Fermentação do meio MRS_{xilose} em biorreator pelo microrganismo selecionado;
- Fermentação do meio MRS_{ALB} e meio MRS_{HBC} pelo microrganismo selecionado;
- Fermentação em meio MRS_{xilose} com variação da concentração de peptona A e com a substituição da peptona A por uréia;

4.2. MATERIAIS

4.2.1. Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (*steam explosion*) utilizado nos experimentos foi proveniente de uma mesma safra e lote, gentilmente fornecido pela Usina Vale do Rosário, localizada no interior do Estado de São Paulo (Orlândia). Após a coleta da matéria-prima, esta foi armazenada em freezer até sua utilização.

4.2.2. Microrganismos

Foram utilizadas cepas de bactérias lácticas provenientes de diversos bancos de cultura (Tabela 4).

Tabela 4. Microrganismos utilizados.

| Microrganismos | Banco de cultura |
|---|--|
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> susp. <i>Lactis</i> ATCC 7830* | Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro-RJ) |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i> ATCC 4797* | |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595* | |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> CCT 3744 | |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B- 227 | NRRL ARS Collection culture (Peoria-Illinois, USA) |
| <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-442 | |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> NRRL B-4449 | |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041* | CCT Coleção de cultura Tropical da Fundação André Tosello (Campinas,SP-Brasil) |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL B-445 | |
| <i>Bacillus coagulans</i> 162 | Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ (Germany). |

* ATCC America Type Culture Collection (Washington, DC - USA).

O *Bacillus coagulans* 162 foi utilizado somente na fermentação do meio ALB.

4.2.3. Reagentes

4.2.3.1. Meio MRS_{xilose}

O meio MRS_{xilose} tem sua composição descrita na Tabela 2, sendo este meio baseado no meio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) padrão usualmente utilizado no cultivo de bactérias lácticas. O meio MRS_{xilose} possui como principal fonte de carbono a xilose, diferentemente do meio MRS padrão que utiliza a glicose. Quando utilizado para a reativação dos microrganismos o meio MRS_{xilose} teve a

xilose substituída por glicose em igual concentração, sendo, então, chamado de meio MRS_{glicose}. Quando o meio MRS_{xilose} foi utilizado sem a presença de qualquer tipo de açúcar, o mesmo recebeu o nome de MRS na ausência de xilose.

Tabela 5. Composição do meio MRS_{xilose}.

| Reagente | Concentração (g/L) |
|---|---------------------------|
| Peptona de soja | 10 |
| Peptona A | 8 |
| Extrato de levedura | 4 |
| Xilose | 20 |
| Acetato de sódio . 3H ₂ O | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| Citrato triamoniaco | 2 |
| Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O) | 0,2 |
| Sulfato de manganês (MnSO ₄ .H ₂ O) | 0,05 |
| Polissorbato 80 (Tween 80) | 1mL |
| Agar microbiológico* | 10 |

*No caso de meio sólido (cultivos em Agar inclinado (tubos) ou placas de Petri)

O meio MRS_{xilose} (Tabela 5) foi utilizado nas fermentações em incubador rotativo das cepas de *Latobacillus*, para a fermentação em biorretator pelo microrganismo selecionado com potencial de aplicação para o processo e para o estudo da variação da concentração de peptona A e da substituição da mesma por uréia.

4.2.3.2. Meio MRS_{ALB} e MRS_{HBC}

A água de lavagem (ALB) e o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (HBC) foram utilizados como fontes de substrato e então, suplementados com os componentes presentes no meio MRS_{xilose} nas mesmas concentrações obtendo-se assim, os meios MRS_{ALB} e MRS_{HBC} (Figura 13).

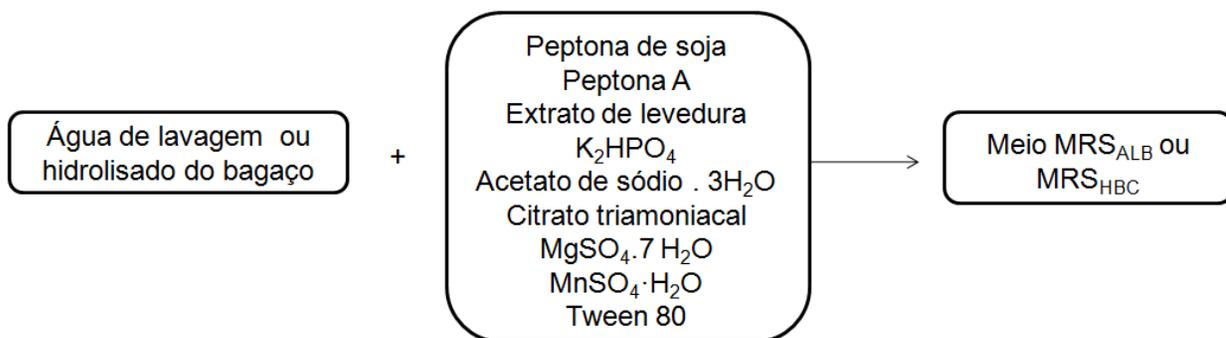


Figura 12. Meios de cultivo MRS_{ALB} ou MRS_{HBC}

A título de comparação o microrganismo *Bacillus coagulans* 162, proveniente do banco de cultura Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ (Germany) foi utilizado na fermentação do meio MRS_{ALB} (Figura 14).

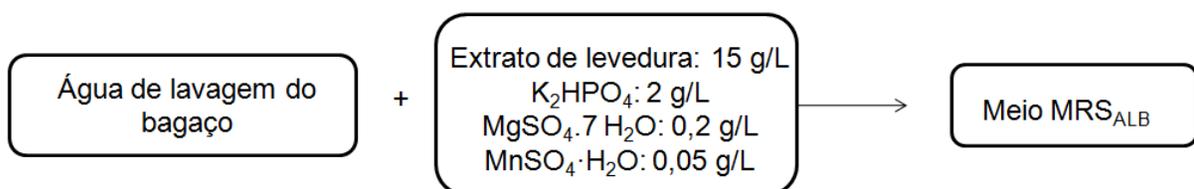


Figura 13. Meio MRS_{ALB} para o *Bacillus coagulans* 162.

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Determinação do teor de umidade (peso seco)

Após o descongelamento do bagaço, amostras em triplicata e homogêneas do material, cerca de 5 g, foram coletadas e secas em estufa a $60^\circ C$ por 24 a 48 horas até atingir peso constante para determinação do teor de umidade do material. As análises foram realizadas em triplicatas.

Para o cálculo do teor de umidade da amostra utilizou-se a Equação 1.

$$w (\%) = \frac{\text{massa do bagaço úmido} - \text{massa do bagaço seco}}{\text{massa do bagaço úmido}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde W representa o teor de umidade do material.

4.3.2. Reativação dos microrganismos

Culturas liofilizadas foram reativadas de acordo com as instruções da coleção da qual a cultura foi obtida. Após a quebra da ampola foi adicionado 0,5 mL de meio MRS_{glicose} (Tabela 5) contendo 20 g/L de glicose, em substituição à xilose, previamente esterilizado à temperatura de 121°C por 15 min. Após a reidratação inicial por 10 a 15 min, o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5 mL do mesmo meio e incubados conforme orientação para cada linhagem.

Para as linhagens adquiridas como culturas reativadas em *slants* foi feito um repique durante 24h em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio MRS_{glicose}.

4.3.3. Manutenção da cultura

Cultivos foram feitos em meio MRS_{glicose} a partir do material celular original recebido do banco de microrganismos. Uma vez atingida a fase exponencial do cultivo, a massa celular não centrifugada foi preservada. Como método de preservação foi utilizado o congelamento usando glicerol como agente protetor e manutenção em Agar inclinado sob refrigeração. Para a manutenção em Agar inclinado ou o congelamento em glicerol as culturas foram repicadas em meio MRS_{glicose} (5 mL) e incubadas durante 24h. No congelamento em glicerol, 1 mL da biomassa obtida neste cultivo foi transferida para um crio-tubo que continha 1 mL de glicerol 20% (v/v) e armazenadas a -20°C. Para a manutenção em Agar inclinado, uma alça deste repique em meio líquido foi transferida para um tubo contendo meio sólido MRS_{glicose}, incubadas por 24h e armazenada a 4°C até seu

uso. Repiques foram feitos a cada dois ou três meses para manter os microrganismos ativos.

4.3.4. Seleção de cepas capazes de produzir ácido a partir de xilose

As culturas de *Lactobacillus* foram testadas quanto a sua capacidade de produzir ácido em meio sólido MRS_{xilose}. Microrganismos foram selecionados mediante o teste de acidificação em meio sólido MRS_{xilose} (Tabela 5) contendo os indicadores de pH verde de bromocresol e púrpura de bromocresol. Foram adicionados ao meio 5 mL/L de cada solução aquosa contendo 10 g/L de cada indicador.

Os indicadores de pH utilizados foram escolhidos levando-se em consideração a faixa de viragem de ambos. O púrpura de bromocresol se mantém roxo/azul em pH 6,2 e amarelo em pH 5,2) e o verde de bromocresol torna-se azul em pH 5,4 e amarelo em pH 3,8 (CAVIN *et al.*, 1989; DAESCHEL *et al.*, 1984). Uma mistura de partes iguais de 0,5% de solução aquosa de púrpura de bromocresol e 0,5% de solução aquosa de verde de bromocresol pode ser utilizada como indicador conferindo uma faixa de viragem mais ampla: a cor do meio permanece violeta em pH 6,2 e amarela em pH 4,0 (VENUS *et al.* 1992).

O meio de cultivo teve seu pH ajustado em pH 6,5 utilizando NaOH 4M e/ou H₃PO₄ 4M e foi esterilizado à temperatura de 121°C durante 15 min. Este meio foi distribuído em placas de Petri para a obtenção de uma camada de 4 a 5 mm de espessura e resfriados à temperatura ambiente até a sua solidificação. A cultura foi transferida assepticamente e as placas incubadas à temperatura ótima de crescimento de acordo com cada espécie de microrganismo (Tabela 6) e examinadas após 24h. Os testes foram realizados em duplicatas.

Tabela 6. Temperatura ótima de crescimento dos microrganismos.

| Microrganismos | T (°C) |
|--|---------------|
| <i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041 | 30 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL B-445 | 37 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> CCT 3744 | 37 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> ATCC 4797 | 37 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> ATCC 7830 | 37 |
| <i>Lactobacillus rahmnosus</i> ATCC 9595 | 37 |
| <i>Lactobacillus casei subsp. rahmnosus</i> NRRL B-442 | 37 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B-227 | 28 |
| <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> NRRL B-4449 | 28 |
| <i>Bacillus coagulans</i> 162 | 52 |

4.3.5. Capacidade de assimilação de xilose e determinação do comportamento cinético das cepas de *Lactobacillus*

Os microrganismos previamente selecionados pelo teste de acidificação em meio sólido foram investigados quanto à cinética de fermentação de xilose em meio líquido visando selecionar os microrganismos que a consumam eficientemente e produzam ácido.

4.3.5.1. Meios de cultivos e preparo do inóculo

As culturas de *Lactobacillus* foram pré-cultivadas em meio líquido MRS_{glicose} (Tabela 5). As cepas foram reativadas pela transferência de duas alças de massa celular da cultura estoque (em Agar inclinado) para 5 mL de meio MRS_{glicose} e incubadas à temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo durante 24 horas.

O *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRRL B-4449 também foi cultivado num meio de cultura proposto por OHARA (2007) e teve seu pH inicial ajustado para 6,7. A composição de acordo com OHARA (2007) é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Meio proposto por OHARA (2007) para *Lactococcus lactis*.

| Reagente | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| Peptona bacteriológica | 10 |
| Extrato de Levedura | 4 |
| Extrato de carne | 8 |
| Xilose | 20 |
| Acetato de sódio . 3H ₂ O | 5 |
| K ₂ HPO ₄ | 2 |
| Citrato triamoniacal | 2 |
| Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O) | 0,2 |
| Sulfato de manganês (MnSO ₄ .H ₂ O) | 0,05 |
| Polissorbato 80 (Tween 80) | 1mL |

O *L. delbrueckii* NRRL B-445 foi testado num meio de cultura proposto por THOMAS (2000) (Tabela 8), tendo seu pH inicial ajustado para 5,0.

Tabela 8. Composição do meio de cultura de acordo com Thomas (2000).

| Reagente | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| Triptona | 27,5 |
| NaCl | 4 |
| Xilose | 20 |
| Ácido ascórbico | 0,5 |
| Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7 H ₂ O) | 1 |
| Acetato de sódio 3 H ₂ O | 1,5 |
| Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄) | 0,4 |

O inóculo foi preparado pela transferência de 1 mL de células em suspensão do pré-inóculo para frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL de meio MRS_{xilose} (Tabela 5) e incubados até atingir uma absorbância total de 3,0 a 7,0 (correspondente a uma leitura no espectrofotômetro de 0,3 a 0,7 numa diluição de 1:10). A duração deste cultivo é geralmente de 24 horas. Isto garantia que a cultura estivesse na fase exponencial de crescimento. O meio MRS_{xilose} teve seu pH ajustado para 6,0 utilizando NaOH 4M e/ou H₃PO₄ 4M.

No preparo dos meios foi feita uma solução concentrada de xilose (120 g/L), esterilizada separadamente para evitar a sua degradação e escurecimento e adicionada assepticamente ao meio na proporção requerida.

Considerando apenas a xilose como fonte de carbono, o meio de cultura que contém esta pentose apresenta uma fração de carbono de 40% correspondente a 8 g/L de carbono. As equações para o cálculo da fração e concentração de carbono do meio são apresentadas nas equações 2 e 3.

$$\text{Fração de carbono da xilose (\%)} = \left(\frac{\text{Massa molec. carbono} * n^{\circ}\text{carbonos}}{\text{Massa molecular xilose}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Carbono} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 20 \frac{\text{g}}{\text{L}} \text{xilose adicionada} * 0,4 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.3.5.2. Condições de fermentação

Os cultivos em meio líquido foram realizados em frascos agitados tipo Erlenmeyer de 100 mL com volume final de trabalho de 30 mL. A formulação do meio de cultura era a mesma que a do meio utilizado no preparo do inóculo, tendo seu pH inicial ajustado para pH 6,0, exceto para o ensaio com *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRRL B-4449 que teve seu pH ajustado para 6,7, utilizando NaOH 4M e/ou H₃PO₄ 4M e esterilizado à temperatura de 121°C durante 15 min. O meio de fermentação foi inoculado com 10% (v/v) do meio de inóculo, incubados à temperatura ótima de cada microrganismo e os cultivos foram conduzidos durante 120 horas. A amostragem foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar em intervalos de tempo determinados e analisadas para a quantificação de açúcares redutores, acidez titulável em ácido lático e crescimento microbiano. Ao final da fermentação foram calculados os parâmetros produtividade volumétrica (Qp) e rendimento (Yp/s) visando selecionar o microrganismo que apresentasse maior capacidade de assimilação de xilose e conversão em ácido lático.

As equações utilizadas para os cálculos da velocidade específica de crescimento (μ_x), produtividades volumétricas de biomassa e ácido, conversão de substrato e rendimentos são apresentados pelas equações de 4 a 9:

Conversão de substrato:

$$\text{Conversão de subst}(\%) = \left(\frac{\text{Conc. xilose inicial} - \text{Conc. xilose final}}{\text{Conc. xilose inicial}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Velocidade específica de crescimento microbiano:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 5})$$

Rendimento de produto de substrato:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{Eq. 6})$$

Rendimento de biomassa de substrato:

$$Y_{X/S} = \frac{X_m - X_0}{S_0 - S} \quad (\text{Eq. 7})$$

Produtividade volumétrica de produto:

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (\text{Eq. 8})$$

Taxa volumétrica de consumo de substrato:

$$Q_S = \frac{S_0 - S}{t} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde,

X_m : Concentração de Biomassa máxima

X_0 : Biomassa inicial

S_0 : Substrato inicial

S: Substrato final consumido

P_f : Produto final formado

P_0 : Produto inicial

t : tempo

4.3.6. Fermentação em incubador rotativo pelo *L. pentosus* ATCC 8041

4.3.6.1. Meio MRS na ausência de xilose

O ensaio fermentativo do meio MRS na ausência de xilose e de outros carboidratos foi realizado em frascos agitados tipo Erlenmeyer de 250 mL com volume de trabalho final de 100 mL. Os frascos foram incubados em incubador rotativo a 30°C e 150 rpm de agitação. O meio de fermentação, com pH inicial 6,0, foi inoculado com 10% (v/v) do meio do inóculo. O cultivo foi realizado durante 164 horas e amostras retiradas assepticamente em câmara de fluxo laminar, em intervalos de tempo determinados e analisadas para pH, crescimento celular e concentração de ácidos lático e acético.

4.3.7. Fermentação em biorreator em modo batelada simples

***Lactobacillus pentosus* ATCC 8041:**

As fermentações em batelada simples do meio MRS_{xilose} , meio MRS_{ALB} e meio MRS_{HBC} foram realizadas num fermentador Biostat A Plus da Sartorius Stedim-Biotech (Alemanha), com cuba de 2L. Os meios foram previamente esterilizados a 121°C por 15 min e teve seu pH inicial ajustado para 6,0 utilizando NaOH 4M e/ou H_3PO_4 4M. A cepa foi reativada da mesma forma já descrita e 1 mL do pré-cultivo foi transferido para frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo

100 mL de meio semelhante ao utilizado no biorreator. Após 24 horas sob agitação de 150 rpm e 30°C, os frascos foram inoculados no biorreator, com absorbância na faixa de 3,0 a 5,0 (correspondendo a uma leitura no espectrofotômetro de 0,3 a 0,5 numa diluição de 10X). As fermentações ocorreram sob as condições operacionais de 150 rpm, 30°C e pH mantido constante (pH 6,0) pela adição de NaOH 20% até o fim do período fermentativo. Amostras de 5 mL do meio fermentado foram retiradas em intervalos regulares de tempos para a determinação da curva de crescimento expressa pela produção de biomassa (g/L), e quantificação de ácido lático e acético e de xilose.

***Bacillus coagulans* 162:**

A fermentação em batelada do meio MRS_{ALB} foi realizada sob as condições operacionais de 150 rpm, 52°C e pH mantido constante (pH 6,0) pela adição de NaOH 20% até o fim do período fermentativo. O volume final de trabalho foi de 1,1 L.

4.3.7.1. Meio MRS_{xilose}

O meio MRS_{xilose} (Tabela 5) foi utilizado para a fermentação em batelada pelo *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 com volume final de trabalho no biorreator de 1,6 L.

4.3.7.2. Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor foi utilizado para a produção da ALB e HBC que foram usadas como fonte de substrato para o preparo do meio de cultivo com o objetivo de estudar o comportamento cinético e a capacidade do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em consumir os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica para a produção de ácido lático.

4.3.7.2.1. Água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (ALB)

Dez por cento (b.s.) do bagaço úmido foi pesado, adicionado o equivalente a 10 vezes seu peso seco em água (volume) a 50°C, mantendo sob agitação de 300 rpm por 2 horas com auxílio de um agitador mecânico. Foi realizada a prensa manual e adicionado mais água a 50°C sobre a torta (o equivalente a 1/5 da água já adicionada) e realizada novamente a prensa. A ALB foi centrifugada a 4500 rpm durante 15 min e posteriormente filtrada em filtro tipo buchner à vácuo para retirada da lignina insolúvel e bagacilho.

4.3.7.2.2. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (HBC)

A hidrólise foi realizada com uma concentração de 10% de bagaço (base seca), sendo realizada a hidrólise total do bagaço, ou seja, utilizando a fração celulósica (torta do bagaço) e hemicelulósica (Figura 14).



Figura 14. Hidrolisado total (fração celulósica + fração hemicelulósica (ALB)).

O bagaço (10% b.s.) foi inicialmente imerso em água a 50°C e mantido sob agitação por 2 horas (Processo de obtenção da ALB). Após esse período, a fração líquida foi separada da torta e filtrada para retirada de partículas finas. Essa fração líquida teve seu pH corrigido para o valor de 4,8 com CaCO₃ 25% (m/v) e foi novamente adicionada à torta. A dosagem de enzimas foi a fornecida pelo fabricante, Novozymes, que pode ser observada na Tabela 9. Utilizou-se a maior dosagem recomendada pelo fabricante para a realização da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. O processo de hidrólise foi realizado a 50°C e 300 rpm durante 48 horas. O hidrolisado foi prensado manualmente e a fração líquida centrifugada a 4500 rpm durante 15 min sendo posteriormente filtrada em filtro tipo buchner à vácuo para retirada de partículas residuais.

Tabela 9. Dosagem de enzimas recomendada pela Novozymes.

| Enzima | Atividade | Dose Recomendada (% v/v) |
|-----------------------------|------------------|---------------------------------|
| Celulase (NS 50013) | 70 FPU/g | 2-6% |
| Celobiase (NS 50010) | 250 CBU/g | 0,2-0,6% |
| Xilanase (NS 50030) | 500 FXU/g | 0,1-0,5% |

O HBC e a ALB foram esterilizados separadamente da solução dos componentes do meio MRS_{xilose}, para evitar a degradação e escurecimento do açúcar e adicionado assepticamente ao biorreator. Foram testados dois meios de cultivo, um contendo somente a ALB (MRS_{ALB}) e outro contendo o HBC (MRS_{HBC}), sendo que o volume final de trabalho no fermentador foi de 1,1 L.

4.3.8. Fermentação em incubador rotativo do meio MRS_{xilose} com variação da concentração de peptona A e substituição da peptona A por uréia pelo *L. pentosus* ATCC 8041

As fermentações foram realizadas em placa de 96 poços com volume final de trabalho de 2 mL, e para a inoculação utilizou-se um replicador (96 pin Replicator, V&P Scientific, US), de acordo com protocolos estabelecidos para microculturas (Ausubel FM. Current protocols in molecular biology. New York, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley, 1992). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 utilizando NaOH 4M e/ou H₃PO₄ 4M. O processo ocorreu sob as condições operacionais de 200 rpm e 30°C durante 96 horas em estufa bacteriológica. Amostras de 100 µL do meio fermentado foram retiradas em intervalos regulares de tempos para a determinação da curva de crescimento expressa pela produção de biomassa (g/L), e determinação do pH, e então centrifugadas a 45000 rpm por 20 min. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de xilose consumida. Um cultivo com meio MRS_{xilose} contendo somente peptona A, em diferentes concentrações, foi realizado para observar seu comportamento.

Na fermentação com variação da peptona A foram utilizadas concentrações de 0 a 8 g/L da mesma (Tabela 10). Considerando que a peptona A possui em torno de 16% de nitrogênio, a concentração de N presente em 8 g/L de peptona A foi de 1,28 g/L. Assim, na substituição de peptona A por uréia a quantidade de cada suplementação destas fontes de nitrogênio foi realizada de maneira a manter a mesma concentração de nitrogênio presente em 8 g/L de peptona A, quantidade utilizada no meio MRS_{xilose} (Tabela 10).

Tabela 10. Concentração de peptona A e uréia no meio MRS_{xilose}.

| | Concentração (g/L) | | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|---|
| Peptona A* | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Uréia** | 2,74 | 2,4 | 2,06 | 1,71 | 1,37 | 1,03 | 0,69 | 0,34 | 0 |

*Concentração de peptona A utilizada nos experimentos da variação da concentração de peptona A e na substituição da mesma por uréia;

**Quantidade de uréia necessária para manter a concentração de N encontrada em 8 g/L de peptona A.

4.3.9. Metodologia analítica

4.3.9.1. Biomassa seca microbiana

A concentração da biomassa foi quantificada mediante leitura espectrofotométrica em 600 nm entre 0.1 – 0.6 unidades de absorbância, usando água destilada como referência de calibração.

Foi construída uma curva padrão para cada microrganismo usando a biomassa obtida no cultivo do inóculo, após 72 horas de cultivo: diferentes diluições foram feitas e para cada concentração de biomassa foi determinada a absorbância a 600nm e massa seca. A massa seca foi determinada após a centrifugação do meio fermentado a 7000 rpm por 10 min, seguido de lavagem das células com água destilada e nova centrifugação e posterior secagem em estufa a 60°C durante 24 horas (até peso constante).

Para a fermentação em incubador rotativo do meio MRS_{xilose} com variação da peptona A e substituição da peptona A por uréia foi utilizado o Multilabel Plate Reader VICTOR X4 Perkin Elmer 2030 versão 4.0 para a leitura da absorbância.

4.3.9.2. Determinação de Açúcares Redutores (AR)

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método colorimétrico Somogyi-Nelson (1945). A Tabela 11 apresenta a composição das soluções utilizadas para a reação.

Tabela 11. Composição das soluções do método colorimétrico Somogyi-Nelson.

| Solução | Reagente | Concentração (g/L) |
|-----------|---|--------------------|
| A | CaCO ₃ anidro | 25 |
| | NaHCO ₃ | 20 |
| | KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O | 25 |
| B | CUSO ₄ | 15 |
| | H ₂ SO ₄ | 1 gota |
| C | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .H ₂ O | 35,7 |
| | H ₂ SO ₄ | 35,7 |
| | Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O | 4,3 |
| AB | 96% solução A + 4% solução B | |

A solução C necessita de incubação a 37°C durante 24 horas. 500 µL da solução AB foram adicionados a 50 µL da amostra convenientemente diluída e os tubos colocados em água fervente por 8 a 10 minutos, seguido de um resfriamento em banho de gelo ou água gelada até atingir a temperatura ambiente. Então, 500 µL da solução C foram adicionados e agitados em vortex e posteriormente adicionou-se 5 mL de água destilada seguido de nova agitação. Aguardou-se 10 minutos e realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm. Uma curva padrão foi construída utilizando água destilada como referência de calibração e a concentração de glicose (0,2 – 1 g/L) foi determinada mediante leitura em espectrofotômetro. A concentração de AR é determinada pela equação 10.

$$AR \left(\frac{g}{L} \right) = a * Abs * diluição \quad (Eq. 10)$$

Onde:

$a = \text{fator de conversão}$

$Abs = \text{absorbância}$

O Multilabel Plate Reader VICTOR X4 Perkin Elmer 2030 versão 4.0 foi utilizado para leituras de absorbância da xilose a 620 nm durante a fermentação

em incubador rotativo do meio MRS_{xilose} com variação da peptona A e substituição da peptona A por uréia.

4.3.9.3. Determinação de acidez titulável em ácido lático

A concentração de ácido lático foi determinada por titulometria com NaOH padronizado 0,1N.

A acidez titulável em termos de ácido lático, o rendimento e a porcentagem de conversão de substrato foram determinados pelas equações 11, 12 e 13.

$$\text{Acidez titul } \text{Ác lát} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{Vol. NaOH (mL)} * \text{Normalidade NaOH} * 90,08}{\text{Vol. amostra (mL)}} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{g \text{ Ác. lático produzido}}{g \text{ substrato consumido}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\text{Conversão de subst(\%)} = \left(\frac{\text{Conc. xilose inicial} - \text{Conc. xilose final}}{\text{Conc. xilose inicial}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

4.3.9.4. Determinação do pH

O pH foi determinado utilizando um pHmetro TEC- 3MP (Tecnal, Brasil) calibrado com solução tampão pH 7,0 e pH 4,0.

4.3.9.5. Determinação de xilose, ácido lático e ácido acético

A concentração de xilose e dos ácidos lático e acético foi determinada utilizando um cromatógrafo de íons (Metrohm). Este equipamento é composto por uma bomba Professional IC 850 Anion-MCS-LP Gradient, amostrador com injetor

automático 863 Compact Auto Sampler, detector amperiométrico 871 Advanced Bioscan; aparelho de interface 771 IC Compact. Para a análise de carboidratos são utilizadas duas colunas Metrosep Carb 1-150 (copolímero de poliestireno/divinilbenzeno), tamanho de partícula 5µm; com dimensões de 150 x 4.0mm) conectadas em série. A fase móvel utilizada foi NaOH 100 mM com fluxo de 1,0 mL/min a 30°C. Para a análise de ácidos orgânicos foi utilizada uma coluna Metrosep Organic Acid (250 x 7,8 mm Metrohm AG CH 9101), utilizando como fase móvel H₂SO₄ 0,5 mM : Acetona (85:15) e LiCl 50 mM.

4.3.9.6. Determinação do isômero do ácido lático

A quiralidade do ácido lático produzido foi determinada pelo uso de um kit enzimático da Boehringer Mannheim (Kit D-lactic acid Boehringer Mannheim, GmbH, Germany). Neste kit a concentração de L(+)-ácido lático foi determinada pela diferença da concentração total de ácido lático determinado por cromatografia. As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm, filtradas em filtro millex 0,45 µm e convenientemente diluídas com água ultra pura. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 340 nm utilizando um equipamento nanofotômetro Pearl (Implen Inc., USA).

4.3.9.7. Análise estatística

O teste de Tukey foi utilizado para avaliar a diferença entre as médias da fermentação com variação da peptona A e a substituição da mesma por uréia com nível de significância de ($p \leq 0,05$), utilizando o programa statistica versão 7.0 (Statistica, Estados Unidos).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CÁLCULO DO TEOR DE UMIDADE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR

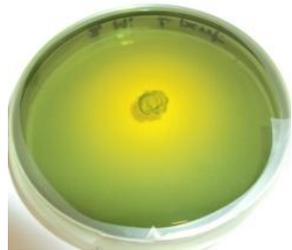
O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor apresentou um teor de umidade de 58,52% e peso seco de 41,48%±0,44% (Tabela 12).

Tabela 12. Porcentagem de umidade do bagaço de cana-de-açúcar após 24h de secagem.

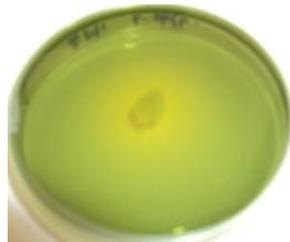
| Massa do bagaço úmido (g) | Massa do bagaço seco (g) | Peso seco (%) |
|--|---|----------------------|
| 5,0279 | 2,9679 | 40,97 |
| 5,0074 | 2,9162 | 41,76 |
| 5,0105 | 2,9208 | 41,71 |
| Média | | 41,48±0,44 |

5.2. SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS CAPAZES DE UTILIZAR XILOSE COMO FONTE DE CARBONO

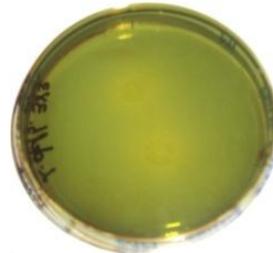
São apresentados na Figura 15 os resultados do teste de acidificação em meio sólido utilizando os indicadores de pH verde de bromocresol e púrpura de bromocresol para as cepas de bactérias lácticas testadas.



(a) *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041



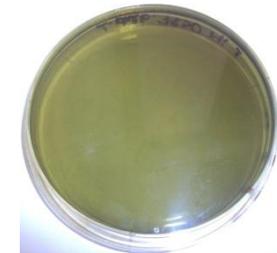
(b) *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-445



(c) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* CCT 3744



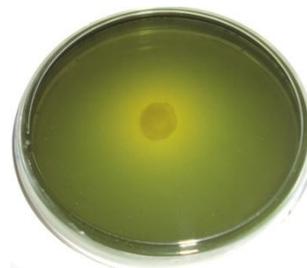
(d) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4797



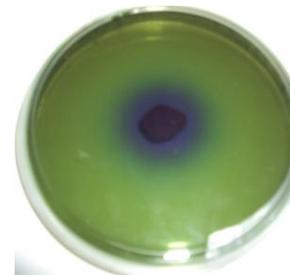
(e) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 7830



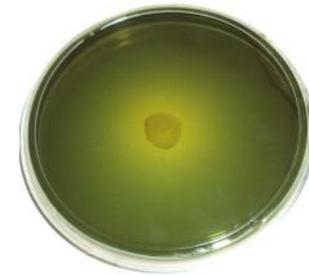
(f) *Lactobacillus rahmnosus* ATCC 9595



(g) *Lactobacillus casei* subsp. *rahmnosus* NRRL B-442



(h) *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227



(i) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NRRL B-4449

Figura 15. Teste de acidificação em meio sólido com xilose utilizando os indicadores de pH verde de bromocresol e púrpura de bromocresol para as espécies de *Lactobacillus* estudadas.

Foi observado (Figura 15) que todas as cepas de bactérias lácticas, exceto o *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 7830, foram capazes de utilizar os componentes do meio de cultura para a produção de ácido. Isto pode ser evidenciado pela alteração de cor do meio para amarelo que é provocado pela diminuição do pH. O *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 7830 apresentou pequeno crescimento em meio sólido, sendo o único microrganismo a não apresentar alteração da cor do meio ao longo do período de incubação. O *Lactobacillus pentosus* NRRL B-227 apresentou bom crescimento em meio sólido, porém apresentou uma região azul-violeta em torno da colônia sugerindo que seu pH manteve-se em torno de 6,2 indicando uma baixa produção de ácido. Foi observado que o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 iniciou a produção de ácido mais rapidamente em relação aos outros microrganismos, o que pode ser um indicativo de maior capacidade de assimilar xilose.

5.3. CAPACIDADE DE ASSIMILAÇÃO DE XILOSE E DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO CINÉTICO DAS CEPAS DE *LACTOBACILLUS*

Os resultados para cada microrganismo em termos de biomassa, consumo de substrato e ácido produzido durante a fermentação são apresentados na Tabela 13.

O *Lactococcus lactis subsp. lactis* NRRL B-4449 foi cultivado num meio de cultura proposto por OHARA (2007) e teve seu pH inicial ajustado para 6,7, pois esta cepa não apresentou crescimento em meio MRS_{xilose} , utilizado para todos os outros microrganismos.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos obtidos durante a fermentação de xilose (20 g/L) em frascos.

| Microrganismo | pH final | Consumo xilose (%) | Ácido produzido* (g/L) | X máx. (g/L) | Q _P máx. (g/[L.h]) | Y _{P/S} (g/g) | Y _{X/S} máx. (g/g) |
|---|----------|--------------------|------------------------|--------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041 | 3,8 | 92,2 | 17,88 | 1,75 | 0,39 | 0,85 | 0,13 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL B-445 | 5,5 | 25,3 | 0,75 | 0,27 | 0,04 | 0,17 | 0,09 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. delbrueckii</i> CCT 3744 | 5,5 | 9,3 | 1,21 | 0,07 | 0,10 | 0,46 | 0,03 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. lactis</i> ATCC 4797 | 5,5 | 19,8 | 1,14 | 0,24 | 0,01 | 0,27 | 0,05 |
| <i>Lactobacillus rahmnosus</i> ATCC 9595 | 5,7 | 31,1 | 0,82 | 0,64 | 0,01 | 0,11 | 0,17 |
| <i>Lactobacillus casei</i> <i>subsp. rahmnosus</i> NRRL B-442 | 5,4 | 28,7 | 1,18 | 0,57 | 0,11 | 0,20 | 0,08 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> NRRL B-227 | 5,5 | 17,0 | 1,41 | 0,79 | 0,01 | 0,43 | 0,19 |
| <i>Lactococcus lactis</i> <i>subsp. lactis</i> NRRL B-4449 ** | 5,7 | 23,5 | 0,9 | 0,57 | 0,01 | 0,18 | 0,09 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> NRRL B-445*** | 4,8 | 16,5 | 1,51 | 0,07 | 0,05 | 0,44 | 0,02 |

*Acidez total titulável em ácido láctico

**Meio proposto por Ohara (2007)

***Meio proposto por Thomas (2000)

Em geral, todos os microrganismos consumiram parcialmente xilose, cujos valores de consumo variam entre 9 a 92%. O consumo de xilose foi considerado baixo sendo produzida baixa concentração de biomassa e ácido lático (acidez titulável em termos de ácido lático) para a maioria dos microrganismos, exceto para o *L. pentosus* ATCC 8041. THOMAS (2000) relata que o *L. delbrueckii* NRRL B-445 foi capaz de assimilar xilose para a produção de ácido lático em meio contendo somente xilose, porém, no presente estudo, o mesmo não apresentou tal capacidade sob as mesmas condições. Foi observado que entre todos os microrganismos utilizados, o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 foi o que mais se destacou quanto à capacidade de utilizar a xilose como fonte de carbono para a produção de ácido (acidez titulável em termos de ácido lático) apresentando rendimento de 85%, produtividade de 0,39 g/[L.h] e alto consumo de substrato (92%).

5.3.1. Comportamento cinético do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em Meio MRS_{xilose}

Como o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 foi o microrganismo que apresentou maior potencial de aplicação para a conversão da xilose em ácido lático, o mesmo foi selecionado para os testes de crescimento celular, consumo de xilose e produção de ácido lático estudados em incubador rotativo (Figura 16).

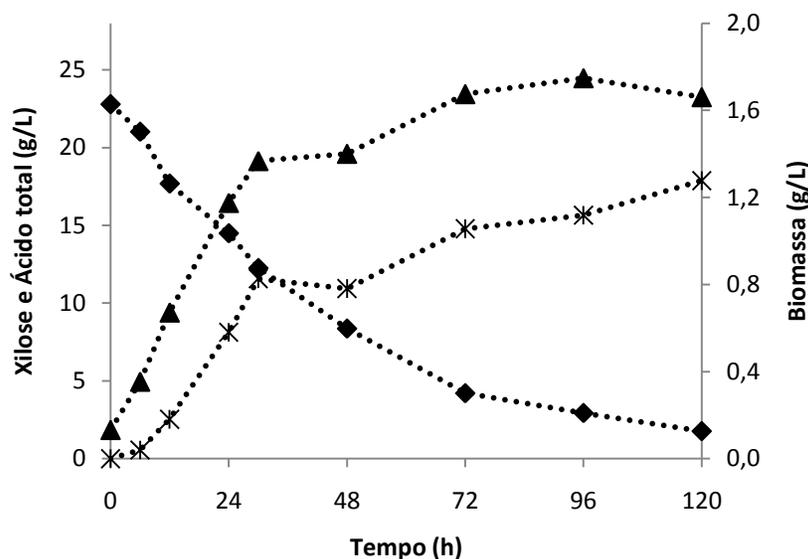


Figura 16. Cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de ácido pelo *L. pentosus* ATCC 8041 da fermentação do meio MRS_{xilose}. (▲) Biomassa, (◆) Xilose, (✕) Ácido total (acidez total titulável em ácido lático). (Condições: 30°C, pH 6,0, 120h, sem agitação).

Não foi observada uma fase de adaptação (fase LAG) do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 e sim um crescimento exponencial e produção logarítmica imediatos até 24 horas de cultivo; a partir de 48 horas a cultura atinge a fase de desaceleração e estabilização (Figura 16). A concentração de biomassa atingiu um valor máximo de 1,75 g/L em 96 horas de cultivo ($Q_{X \text{ máx}} = 0,045 \text{ g/[L.h]}$ em 12 horas) e a velocidade específica máxima de crescimento alcançou $0,104 \text{ h}^{-1}$ em 6 horas de fermentação. A acidez titulável alcançada em termos de ácido lático foi de 17,88 g/L após 120 horas de cultivo atingindo rendimento de 85,04% e uma produtividade volumétrica máxima de $0,386 \text{ g/[L.h]}$ em 30 horas de cultivo. A conversão de substrato de 92% atingiu uma taxa volumétrica máxima de consumo de substrato de $Q_S = 0,425 \text{ g/[L.h]}$ em 12 horas de cultivo. O valor do pH apresentou redução expressiva durante a fermentação, partindo de pH 6,0 para pH 3,8 em 72h de fermentação. A xilose foi consumida quase em sua totalidade, evidenciando a habilidade do *L. pentosus* ATCC 8041 em assimilar este substrato para a produção de ácido. O *L. pentosus* ATCC 8041 é considerado um microrganismo heterofermentativo facultativo, que é caracterizado pela habilidade

em degradar hexoses (glicose) pela via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Figura 4) e pentoses (xilose e arabinose) pela via fosfoquetolase (PK) (Figura 5). Esta cepa tem sido bastante utilizada na fermentação de hidrolisados de resíduos agroindustriais para a produção de ácido lático como, por exemplo, o lodo de papel reciclado utilizado por MARQUES *et al.* (2008) e o hidrolisado do bagaço de uva estudado por RIVERA *et al.* (2007), atingindo rendimentos de 0,97 g/g e 0,71 g/g e produtividades de 2,9 g/[L.h] e 0,476 g/[L.h], respectivamente. A fermentação de açúcares hemicelulósicos, como xilose e arabinose, na presença de hexoses não é um obstáculo para a conversão econômica por este microrganismo. Entre os resíduos podem ser citados o hidrolisado de bagaço de uva, de poda de vinhedos, de farelo de cevada (RIVERA *et al.*, 2009; BUSTOS *et al.* 2007; MOLDES *et al.*, 2006).

Os experimentos em frascos agitados e em biorreator visaram estabelecer o comportamento do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em meio MRS na ausência de xilose e no meio MRS_{xilose}, respectivamente. O experimento em frascos agitados em meio MRS na ausência de xilose foi utilizado como controle para verificar a capacidade que o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 possui em utilizar as fontes de carbono presentes no meio MRS_{xilose} para seu crescimento celular e produção dos ácidos lático e acético.

5.4. FERMENTAÇÃO EM INCUBADOR ROTATIVO PELO *LACTOBACILLUS PENTOSUS* ATCC 8041

5.4.1. Meio MRS na ausência de xilose

Para verificação do efeito do meio MRS na ausência de xilose sobre o comportamento da cepa, foi realizado um teste em incubador rotativo. O resultado deste teste está representado na Figura 17.

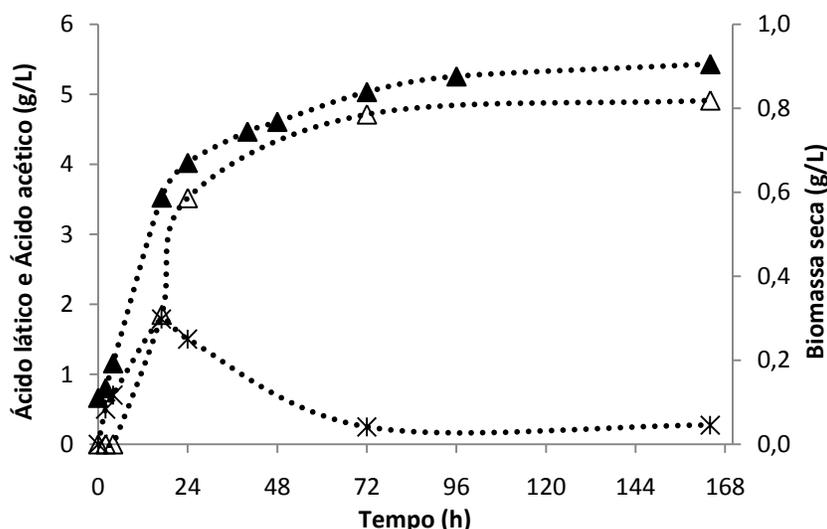


Figura 17. Perfil de crescimento e produção do ácido lático e ácido acético em meio MRS na ausência de xilose. (▲) Biomassa, (X) Ácido lático, (Δ) Ácido acético. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 164h).

O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 não apresenta fase de adaptação e sim um período de crescimento exponencial imediato que se estabiliza após 72 horas de cultivo (Figura 17). A concentração de biomassa atingida foi em torno de 0,9 g/L alcançando a velocidade específica máxima de crescimento de $0,11 \text{ h}^{-1}$ em 4 horas de fermentação. Foi observada a produção de 1,8 g/L de ácido lático em 17 horas de cultivo, porém o mesmo foi consumido após 72 horas, podendo ter sido utilizado para a manutenção da viabilidade celular devido à limitação de carbono (substrato) imposta pelo meio MRS na ausência de xilose. O ácido acético foi o segundo principal produto da fermentação tendo alcançado 4,91 g/L, originado das fontes de nutrientes complexas (peptona animal, extrato de levedura, peptona de soja, aminoácidos e vitaminas). De acordo com a Difco, a peptona de soja é rica em proteína de alta qualidade, carboidratos, cálcio e vitaminas do complexo B e a peptona animal é originada de proteínas de fonte animal que são hidrolisadas a aminoácidos e peptídeos para fornecer nitrogênio aos microrganismos. Os aminoácidos livres gerados pela hidrólise das proteínas podem também ser convertidos em novas proteínas ou em outros produtos

biosintéticos (RAWN, 1989). O catabolismo de aminoácidos por bactérias lácticas apresenta um importante papel para obtenção de energia para processos metabólicos em condições limitadas de nutrientes (GOBBETTI *et al.*, 2005, RAWN, 1989). O extrato de levedura é considerado uma fonte barata de vitaminas, sendo reconhecido como a maior fonte de vitaminas do complexo B, além de fornecer carboidratos, proteínas e alguns micronutrientes. Isto mostra o potencial destas fontes de nitrogênio complexas para utilização em processos fermentativos, podendo auxiliar na manutenção celular e geração de produtos. Assim, quando as bactérias são expostas a uma mistura de fontes de carbono, elas escolhem o substrato que produz o máximo rendimento para seu crescimento ou usam obrigatoriamente substratos não-convencionais (GOBBETTI *et al.*, 2005). Para o teste em meio MRS na ausência de xilose as fontes de nitrogênio representam em torno de 81% do total da fração de carbono do meio e 87% do total da fração de nitrogênio.

O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 apresentou habilidade em se desenvolver e produzir ácidos em meio com ausência de açúcares como fonte principal de carbono.

5.5. FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR EM MODO BATELADA SIMPLES

5.5.1. Fermentação em batelada do meio MRS_{xilose} pelo *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041

Na cinética de crescimento do *L. pentosus* ATCC 8041 foi observada uma fase de adaptação de aproximadamente 6 horas, seguido de uma fase de crescimento exponencial e finalmente o período de estabilização após 48 horas de cultivo (Figura 18). A concentração máxima de biomassa de 1,61 g/L foi atingida em 54 horas de fermentação, apresentando a máxima velocidade específica de crescimento de 0,157 h⁻¹ em 3 horas de cultivo. A máxima produtividade volumétrica de biomassa ($Q_{Xmáx}$) alcançou 0,040 g/[L.h] em 9 horas de fermentação e neste mesmo período a taxa volumétrica de consumo de substrato

atingiu o valor máximo de 0,510 g/[L.h]. A completa exaustão da xilose foi alcançada em 48 horas mostrando que esta cepa possui habilidade de fermentar esta pentose para produção de ácidos. A concentração de ácido lático foi de 11,68 g/L após 48 horas de fermentação, representando a máxima produtividade volumétrica (Q_P) de 0,24 (g/[L.h]) e um rendimento de produto ($Y_{P/S}$) de 0,58 g/g de xilose. A forma isomérica D(-)-ácido lático representou 62% do total de ácido lático produzido. O ácido acético foi produzido em concentração similar à atingida para o ácido lático, 13,06 g/L. Isso pode ser devido à composição do meio que pode ter incrementado a produção deste ácido orgânico, assim como já observado na fermentação do meio MRS na ausência de xilose (Figura 17). Além disso, a xilose representa apenas 40% do total da fração de carbono do meio MRS_{xilose} e sabe-se que na fermentação heterolática o rendimento máximo teórico de ácido lático e ácido acético a partir de pentoses é de 60% e 40%, respectivamente. GOBBETTI *et al.*, (2005) relatou que algumas espécies de *Lactobacillus* apresentaram maior produção de ácido acético quando a xilose, ribose e arabinose foram utilizadas no meio de cultura ao invés de maltose. Rivera *et al.*, (2009) relata que na fermentação de meio sintético suplementado com extrato de levedura e água de maceração de milho e na presença de minerais (Mn, K, Na, Ca e Mg) utilizando o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041, a concentração de ácido acético foi maior do que nos experimentos realizados na ausência de minerais. Assim, foi considerado que 8,15 g/L ($Y_{P/S}$ de 0,40 g/g) seriam produzidos a partir do substrato e 4,91 g/L de ácido acético por outros componentes do meio, como peptonas e extrato de levedura.

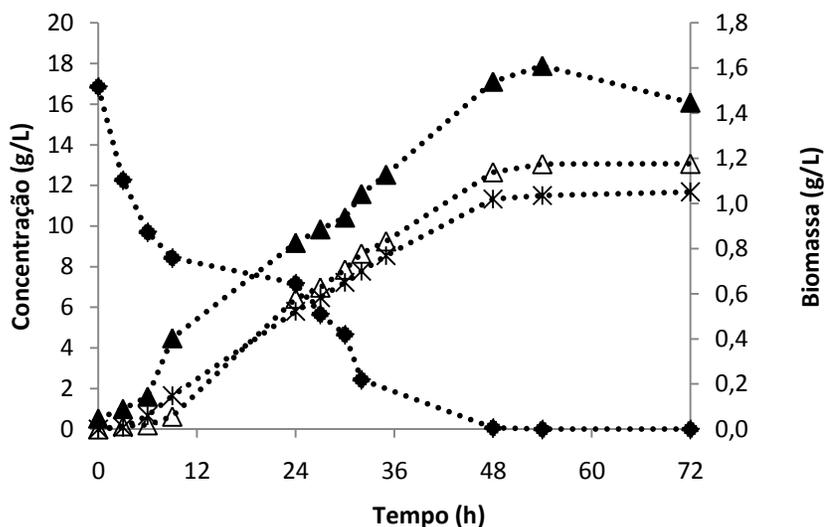


Figura 18. Perfil de consumo de xilose, crescimento celular em produção de ácidos lático e acético na fermentação em batelada do meio $MRS_{xilose-}$. (▲) Biomassa, (◆) Xilose, (X) Ácido lático, (Δ) Ácido acético. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 72h)

O microrganismo apresentou crescimento celular relativamente baixo, porém consumiu todo substrato presente no meio. Isto pode ser considerada uma vantagem quando pensamos na obtenção de um produto via fermentação microbiana, pois pode significar que a cepa utiliza pouco substrato para seu crescimento e manutenção celular, sendo a maior parte utilizada na obtenção do produto desejado.

5.5.2. Fermentação láctica do meio MRS_{ALB}

5.5.2.1. *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041

A composição do meio MRS_{ALB} foi de 1,20 g/L de glicose, 2,26 g/L de xilose e 0,60 g/L de arabinose, apresentando uma concentração total de açúcares de 4,06 g/L. A Figura 19 apresenta o perfil cromatográfico de glicose, xilose e arabinose presentes no meio MRS_{ALB} .

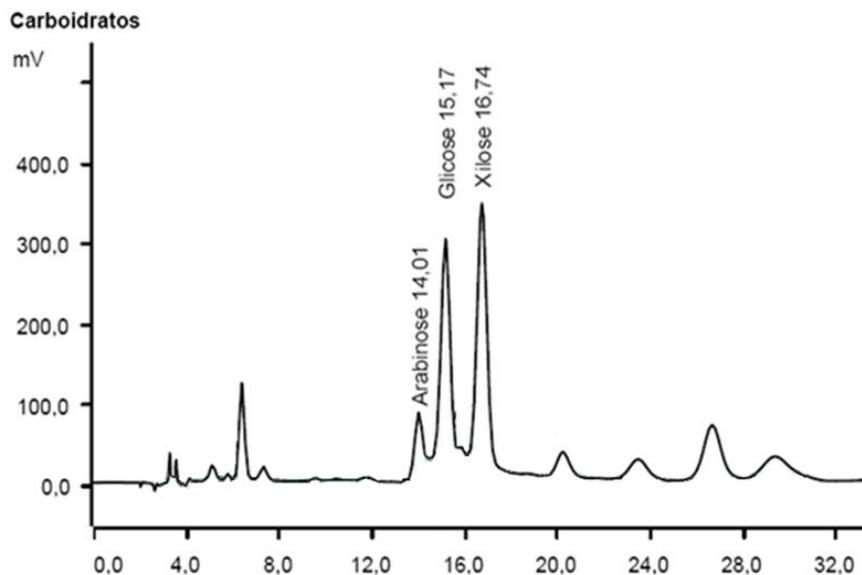


Figura 19. Cromatograma de glicose, xilose e arabinose presentes no meio MRS_{ALB}.

Pode-se notar na Figura 20 (A) que o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 consumiu glicose, xilose e arabinose simultaneamente, tendo a glicose se esgotado rapidamente nas primeiras 6 horas de fermentação enquanto a xilose e arabinose foram consumidas mais lentamente. Isto evidencia a preferência deste microrganismo por hexoses. Foi possível observar que este microrganismo pode fermentar eficientemente xilose e arabinose na presença de glicose, assim como pôde ser verificado por BUSTOS *et al.*, (2005) na fermentação do hidrolisado de resíduos de corte de ramos de videira utilizando a mesma cepa. Tendências similares também puderam ser observadas por outros autores trabalhando com meio de fermentação constituído de glicose e xilose (RIVERA *et al.*, 2009; MOLDES *et al.*, 2006; TANIGUCHI *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008). TANIGUCHI *et al.*, (2004) observaram o consumo completo dos carboidratos (50 g/L de xilose e 100 g/L de glicose) quando co-cultivou em dois estágios de inoculação o *Enterococcus casseliflavus* e o *Lactobacillus casei* em meio MRS atingindo a concentração de 95 g/L de ácido lático. LIU *et al.*, (2008) reportou que o *Lactobacillus buchneri* NRRL B-30929 consumiu glicose e xilose simultaneamente

nas concentrações de 125 g/L, e pH controlado em 6,0. Porém, o *Lactobacillus xylosus* não foi capaz de assimilar xilose quando cultivado em meio contendo concentrações de glicose superiores a 3,3 g/L segundo TYREE *et al.*, (1990).

A cinética de fermentação (Figura 20 (A, B)) mostra que o meio de fermentação adequado pode ser preparado a partir da ALB, já que este é rico em açúcares hemicelulósicos, principalmente xilose, uma vez que esta fração líquida não é utilizada pelas indústrias na produção de compostos de interesse, como etanol e ácidos orgânicos, via fermentação microbiana do bagaço de cana-de-açúcar. Geralmente a ALB não é aproveitada pelas indústrias, pois a fração hemicelulósica é mais difícil de ser assimilada do que a fração celulósica. Embora, existam muitos estudos sobre a fração rica em pentoses já que muitas espécies de *Lactobacillus* são incapazes de utilizá-las como fonte de carbono (BUSTOS *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2004). O *L. pentosus* ATCC 8041 apresentou conversão de substrato de 90% com a máxima taxa volumétrica de consumo de substrato (Q_s) de 0,44 g/[L.h] atingida em 6 horas de fermentação. A concentração final de 2,37 g/L de ácido lático alcançada depois de 27 horas de fermentação representa um rendimento de produto ($Y_{P/S}$) de 0,65 g/g, um rendimento teórico ($Y_{P/S \text{ teórico}}$) de 0,72 g/g e a máxima produtividade volumétrica (Q_P) de 0,23 g/[L.h] foi atingida em 6 horas de cultivo. A forma isomérica D(-)-ácido lático representou 66% da concentração total de ácido lático produzido. Inicialmente, o meio MRS_{ALB} continha 4,88 g/L de ácido acético. Além desta quantidade inicial presente no meio, foi produzido 0,99 g/L de ácido acético o qual representou um rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,27 g/g.

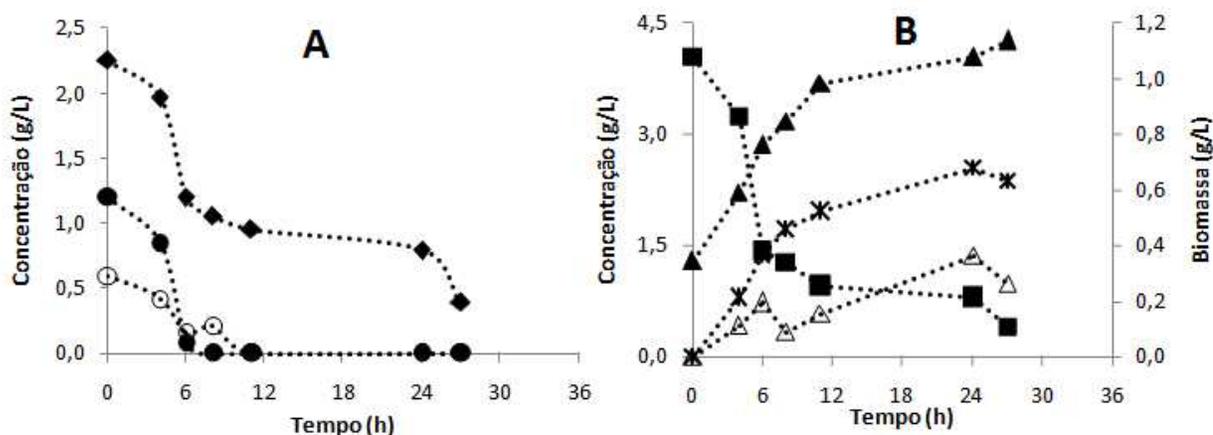


Figura 20. (A) Perfil do consumo de carboidratos; (B) cinética de crescimento e produção de ácidos orgânicos durante a fermentação do meio MRS_{ALB} pelo *L. pentosus* ATCC 8041. (◆) Xilose, (●) Glicose, (○) Arabinose, (■) Açúcar total, (▲) Biomassa, (X) Ácido lático, (Δ) Ácido acético. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 28h).

O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 apresentou crescimento celular exponencial imediato, não apresentando inibição pelo substrato ou subprodutos, indicando também a eficiência da prévia adaptação ao meio de cultivo durante a fase de preparo do inóculo (Figura 20 (B)). A concentração de biomassa foi de 1,14 g/L atingindo a velocidade máxima específica de crescimento de $0,103 \text{ h}^{-1}$ em 4 horas.

5.5.2.2. *Bacillus coagulans* 162

Um segundo experimento foi realizado com outro microrganismo, o *Bacillus coagulans* 162, e desta vez o meio MRS_{ALB} continha 2,1 g/L de xilose, 0,08 g/L de glicose e 0,04 g/L de arabinose, totalizando 2,22 g/L de açúcares. Não foi observada fase lag das células de *Bacillus coagulans* 162 e sim uma fase de crescimento exponencial durante as primeiras 10 horas de cultivo, período em que praticamente a concentração de açúcares havia se esgotado (Figura 21 (A)). A máxima concentração de 0,93 g/L de biomassa foi atingida em 10 horas de cultivo.

O *Bacillus coagulans* 162 apresentou a máxima taxa volumétrica de consumo de substrato (Q_s) de 0,41 g/[L.h] inferior à alcançada pelo *L. pentosus* ATCC 8041, que foi de 0,44 g/[L.h], porém num menor período de tempo, em 2 horas de cultivo. O *B. coagulans* 162 consumiu os açúcares, tendo esgotado a glicose preferencialmente, após 2 horas de cultivo, seguido do consumo de xilose e arabinose mais lentamente (Figura 21 (A)). O processo fermentativo teve duração de 12 horas, período em que o substrato havia se esgotado. Foram produzidos 1,88 g/L de ácido lático, representando um rendimento ($Y_{p/s}$) de 0,85 g/g e a máxima produtividade volumétrica (Q_p) de 0,35 g/[L.h] foi atingida em 2 horas de cultivo. Além da concentração inicial de 3,2 g/L de ácido acético presente no meio MRS_{ALB}, não foi detectada uma produção relevante do mesmo, sendo apenas de 0,5 g/L após 10 horas (Figura 21 (B)). O *B. coagulans* 162 mostrou grande habilidade em converter os açúcares hemicelulósicos em ácido lático, apresentando melhor rendimento de produto (0,85 g/g) em relação ao *L. pentosus* ATCC 8041 (0,65 g/g) quando o MRS_{ALB} foi utilizado como meio de fermentação. O *B. coagulans* é um microrganismo que apresenta característica homofermentativa consumindo xilose através da via pentose-fosfato (Figura 22), resultando quase que somente em ácido lático (Walton *et al.*, 2010). A velocidade específica de crescimento (μ_x) de 0,199 h⁻¹ do *B. coagulans* 162 foi maior que a atingida pelo *L. pentosus* ATCC 8041 de 0,103 h⁻¹ durante o mesmo período de tempo, 4 horas.

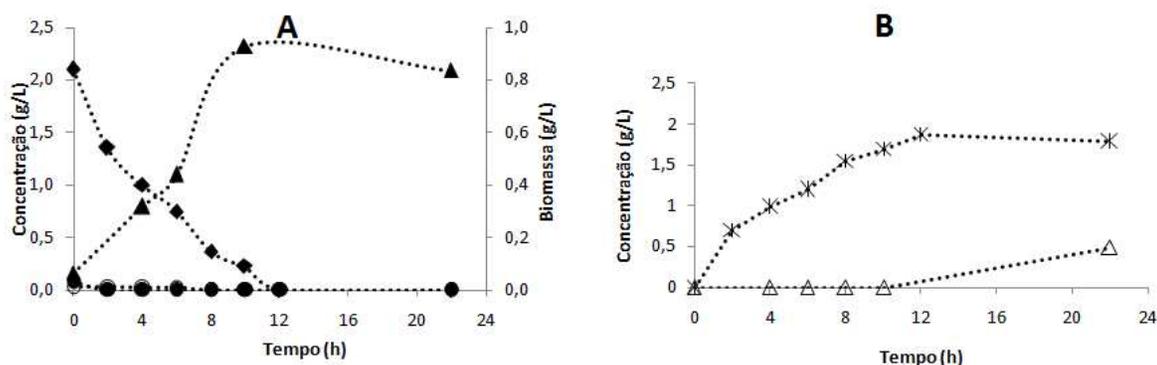


Figura 21. (A) Perfil do consumo de carboidratos e cinética de crescimento; (B) produção de ácido durante a fermentação do meio MRS_{ALB} pelo *Bacillus coagulans* 162 (◆) Xilose, (●) Glicose, (○) Arabinose, (▲) Biomassa, (X) Ácido lático, (Δ) Ácido acético. (Condições: 52°C, 150 rpm, pH 6,0, 28h).



Figura 22. Via pentose-fosfato (Adaptado de CHAMPE *et al.*, 2005).

5.5.3. Fermentação láctica do meio MRS_{HBC}

A composição do meio MRS_{HBC} foi de 21,65 g/L de glicose, 13,89 g/L de xilose e 1,71 g/L de arabinose totalizando 37,24 g/L de açúcares totais. O perfil cromatográfico dos açúcares presentes no meio MRS_{HBC} pode ser observado na Figura 23.

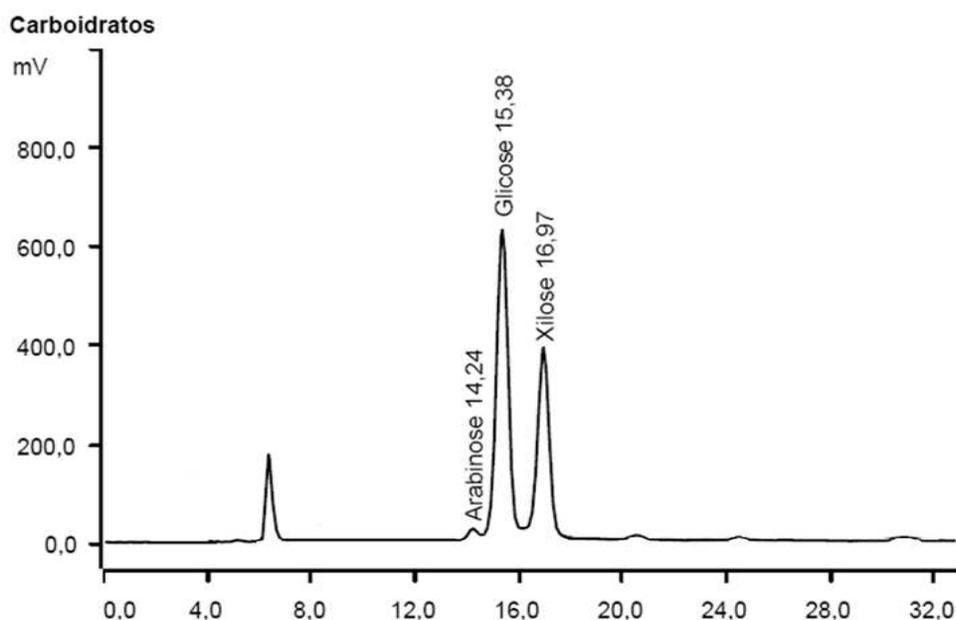


Figura 23. Cromatograma de glicose, xilose e arabinose presentes no meio MRS_{HBC}.

Na cinética de crescimento do *L. pentosus* ATCC 8041, o microrganismo apresentou o mesmo comportamento observado anteriormente, ou seja, fase de adaptação inexistente e crescimento exponencial imediato, pois o microrganismo já se encontrava adaptado ao meio de cultura composto pelo HBC. O período de estabilização teve seu início após 20 horas de cultivo (Figura 24 (B)). O microrganismo atingiu a concentração de 10,6 g/L de biomassa seca com a máxima velocidade específica de crescimento de 0,17 h⁻¹ em 2 horas de fermentação. A máxima produtividade volumétrica de biomassa ($Q_{x\text{máx}}$) alcançou 0,72 g/[L.h] em 10 horas de fermentação. O *L. pentosus* apresentou grande habilidade em fermentar os açúcares hemicelulósicos com a máxima taxa

volumétrica de consumo de substrato (Q_s) de 2,94 g/[L.h] em 8 horas de cultivo, bom crescimento celular e total assimilação do substrato em 20 horas de fermentação, sem apreciável inibição.

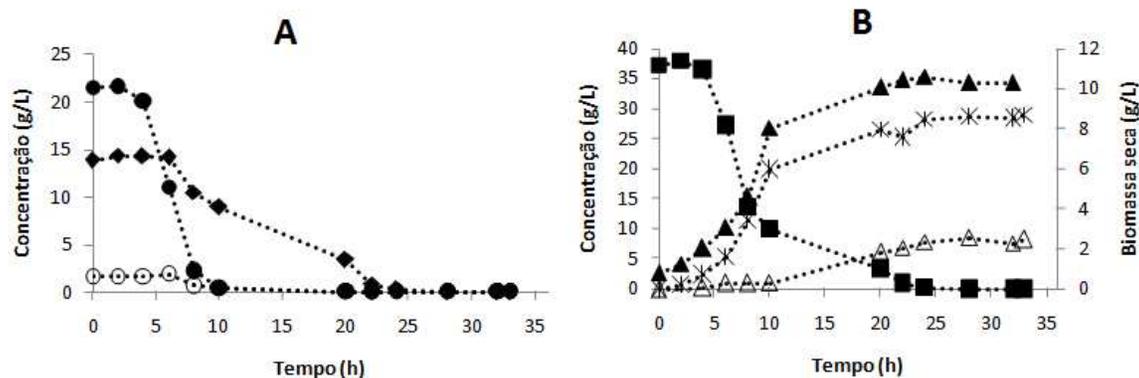
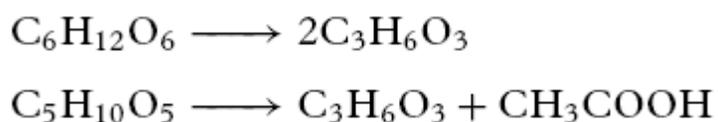


Figura 24. (A) Perfil do consumo de carboidratos; (B) cinética de crescimento e produção de ácidos orgânicos durante a fermentação do meio MRS_{HBC} . (◆) Xilose, (●) Glicose, (○) Arabinose, (■) Açúcar total, (▲) Biomassa, (X) Ácido lático, (Δ) Ácido acético. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 33h).

A Figura 24 (A) apresenta o perfil de consumo das fontes de carbono pelo *L. pentosus* ATCC 8041. Novamente, a glicose foi o primeiro açúcar a ser esgotado, seguido da xilose e arabinose. A concentração final de 28,99 g/L de ácido lático representa um rendimento de produto ($Y_{P/S}$) de 0,78 g/g, um rendimento teórico ($Y_{P/S \text{ teórico}}$) de 83% e a máxima produtividade volumétrica (Q_P) de 1,99 g/[L.h] que foi alcançada em 10 horas de fermentação. Foram produzidos cerca de 53% da forma isomérica D(-)-ácido lático. Além da concentração inicial de 7,4 g/L de ácido acético contida no meio MRS_{HBC} , o mesmo foi também produzido pelo metabolismo de xilose e arabinose pela via fosfoquetolase atingindo uma valor final de 8,19 g/L com um rendimento de ácido acético ($Y_{P/S}$) de 0,21 g/g e a máxima produtividade volumétrica (Q_P) de 0,33 g/[L.h] foi atingida em 24 horas de cultivo. O perfil de fermentação, nas Figuras 24 (A, B), indica que a maior produção de ácido acético iniciou após 10 horas de cultivo, logo após o consumo total da glicose, mostrando que a co-produção de ácido acético originou do metabolismo de xilose e arabinose. Estes resultados são particularmente interessantes, porque significa que na ausência de glicose a via do *L. pentosus*

muda de homo para heterofermentativa. O metabolismo para a degradação de açúcares durante a via heterofermentativa segue a via Fosfoquetolase indicada na Figura 5. Assim, o *L. pentosus* pode ser considerado um microrganismo heterofermentativo facultativo, degradando hexoses (glicose) via Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) (Figura 4) e pentoses (xilose e arabinose) via Fosfoquetolase (PK) (Figura 5) (LI & CUI, 2010; RIVERA *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2006; MOLDES *et al.*, 2006; BUSTOS *et al.*, 2007; BUSTOS *et al.*, 2005; BUSTOS *et al.*, 2004; GARDE *et al.*, 2002). Além disso, outras bactérias ácido lácticas como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus xylosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus buchneri* podem fermentar pentoses via fosfoquetolase (LIU *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2006; GARDE *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2002). Na via fosfoquetolase, o rendimento máximo teórico de ácido lático é limitado a 1 por pentose, ou seja, 0,6 g de ácido lático por g de pentose, devido à perda de 2 átomos de carbono para a formação de ácido acético. Assim, temos que na fermentação de heterolática podem ser formados 2 mols de ácido lático por mol de glicose e 1 mol de ácido lático + 1 mol de ácido acético ou etanol por mol de xilose seguindo a equação estequiométrica global (ZHU *et al.*, 2007; BUSTOS *et al.*, 2007; MOLDES *et al.*, 2006; BUSTOS *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2004; GARDE *et al.*, 2002; IYER *et al.*, 2000):



O perfil cinético de fermentação (Figuras 24 (A, B)) mostra que o HBC pode ser usado como fonte de substrato para a produção biotecnológica de ácido lático pelo *L. pentosus* ATCC 8041. Estudos da produção de ácido lático por este microrganismo utilizando outros hidrolisados de resíduos agroindustriais, como o hidrolisado do bagaço de uva, de resíduos do corte de ramos de videira, de *Eucalyptus globulus*, de farelo de cevada e do sabugo de milho foram reportados por RIVERA *et al.*, 2009; BUSTOS *et al.*, 2007; MOLDES *et al.*, 2006; BUSTOS *et*

al., 2005 e BUSTOS *et al.*, 2004. O uso do MRS_{HBC} como meio de fermentação em processos de bioconversão representa uma fonte potencialmente barata e renovável de açúcares fermentescíveis ao mesmo tempo em que seria uma alternativa para a utilização do bagaço remanescente das usinas de açúcar e álcool que, geralmente, é empregado na geração de energia das mesmas.

A Figura 25 apresenta o perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético) formados na fermentação do meio MRS_{HBC} pelo *L. pentosus* ATCC 8041.

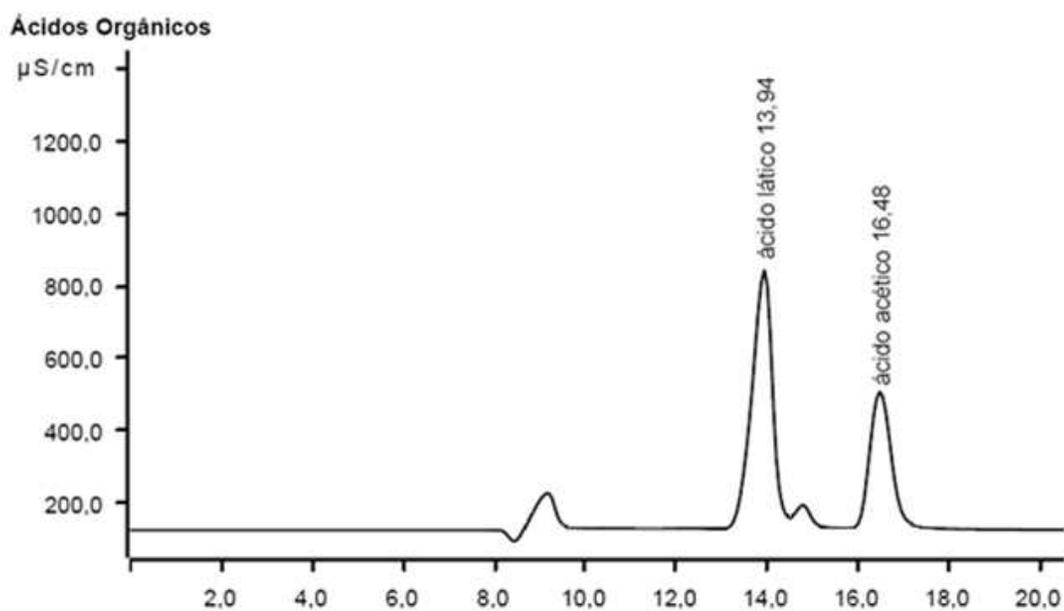


Figura 25. Cromatograma dos ácidos orgânicos formados na fermentação do meio MRS_{HBC} pelo *L. pentosus* ATCC 8041.

Podemos observar na Tabela 14 que a utilização da ALB e do HBC como fontes de substrato para a produção de ácido lático, estudados no presente trabalho, apresentam-se dentro da faixa de rendimentos obtidos por diversos autores com a utilização de diferentes resíduos agroindustriais. O *L. pentosus* ATCC 8041 tem sido bastante estudado e o maior rendimento de ácido lático foi alcançado com a utilização do lodo de papel reciclado com 0,97 g/g, seguido do

hidrolisado do bagaço de cana e de resíduos de corte de ramos de videira, com 0,78 e 0,77 g/g, respectivamente. Isto mostra o potencial de utilização desta bactéria láctica para a produção de ácido láctico a partir de materiais lignocelulósicos via processos biotecnológicos.

Tabela 14. Produção de ácido lático por bactérias lácticas a partir de resíduos agroindustriais.

| Microrganismo | Resíduo | Substrato total (g/L) | Rendimento de ácido lático (g/g) | Concentração final de ácido lático (g/L) | Referências |
|---|--|------------------------------|---|---|------------------------------|
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Hidrolisado do Bagaço de cana | 37,24 | 0,78 | 28,99 | Presente trabalho |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Água de lavagem do bagaço de cana | 4,06 | 0,65 | 2,37 | Presente trabalho |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Hidrolisado do bagaço de Uva | 12,3 | 0,55 | 6,5 | Rivera <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> MTCC 1407 | Resíduo fibroso da mandioca | 60 | 0,49 | 29,9 | Ray <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 | Lodo de papel reciclado | 75,9 | 0,97 | 73 | Marques <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Lactobacillus bif fermentans</i> DSM (20003) | Hidrolisado do farelo de trigo | 97 | 0,83 | 63 | Givry <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Hidrolisado de resíduos de corte de ramos de videira | 33,4 | 0,74 | 24,5 | Bustos <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Hidrolisado do bagaço de Uva | 12,5 | 0,71 | 7,2 | Rivera <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Palha de milho | Dado não disponível | 0,65 | 74,8 | Zhu <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>L. delbrueckii</i> NCIM 2365 (Mutante Uc-3) | Bagaço de cana derivado de celulose | 80 | 0,83 | 67 | Adsul <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Brotos de videira | 35 | 0,76 | 26,5 | Moldes <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Resíduos de <i>Eucalyptus globulus</i> desintoxicado | 18 | 0,70 | 14,5 | Moldes <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Resíduos de farelo de casca de cevada | 57 | 0,57 | 33,7 | Moldes <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Sabugo de milho | 35 | 0,53 | 24,7 | Moldes <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Hidrolisado de resíduos de corte de ramos de videira | 33,8 | 0,61 | 21,8 | Bustos <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>L. pentosus</i> ATCC 8041 | Hidrolisado de resíduos de corte de ramos de videira | 27,8 | 0,77 | 21,8 | Bustos <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>L. pentosus</i> CHCC 2355 e <i>L. brevis</i> CHCC 2097 | Palha do trigo | 9 | 0,95 | 8,5 | Garde <i>et al.</i> , 2002 |

5.6. FERMENTAÇÃO EM INCUBADOR ROTATIVO DO MEIO MRS_{XILOSE} COM VARIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEPTONA A E SUBSTITUIÇÃO DA PEPTONA A POR URÉIA

5.6.1. Fermentação em meio MRS_{xilose} com variação da concentração de peptona A

Na cinética de crescimento do *L. pentosus* ATCC 8041, não se observa um período de adaptação e a concentração máxima de biomassa foi atingida entre 24 e 30 horas de cultivo, período no qual representa a fase de estabilização da biomassa, seguido do período de morte celular. Este comportamento foi observado para todas as concentrações de peptona A utilizadas no meio MRS contendo xilose (Figura 26, Tabela 15).

Pelo teste de Tukey (Tabela 15) observamos que a biomassa formada em diferentes concentrações de Peptona A nos tempos 0, 6, 30, 48 e 72 horas são estatisticamente iguais ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). É possível notar que em 24 horas de cultivo a utilização de 0 g/L e 8 g/L de Peptona A possui o mesmo efeito sobre a concentração de biomassa do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041. A capacidade do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em se desenvolver em meio MRS_{xilose} na ausência de Peptona A torna-se uma vantagem, pois acarretará numa diminuição dos custos de processo com a suplementação de nutrientes, tornando o custo da produção de ácido lático mais barata.

A utilização de 1 g/L de Peptona A nos tempos 24 e 30 horas implica numa maior concentração de biomassa (Tabela 15). Porém, ao longo do período fermentativo a utilização de 0 ou 1 g/L de Peptona A possui pouca diferença em termos de concentração de biomassa mas são estatisticamente diferentes ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) no tempo de 24 horas. Assim, pode-se optar por utilizar a concentração de 1 g/L de peptona A, pois o *L. pentosus* ATCC 8041 apresentou maior velocidade de crescimento e concentração celular na presença desta fonte de nitrogênio.

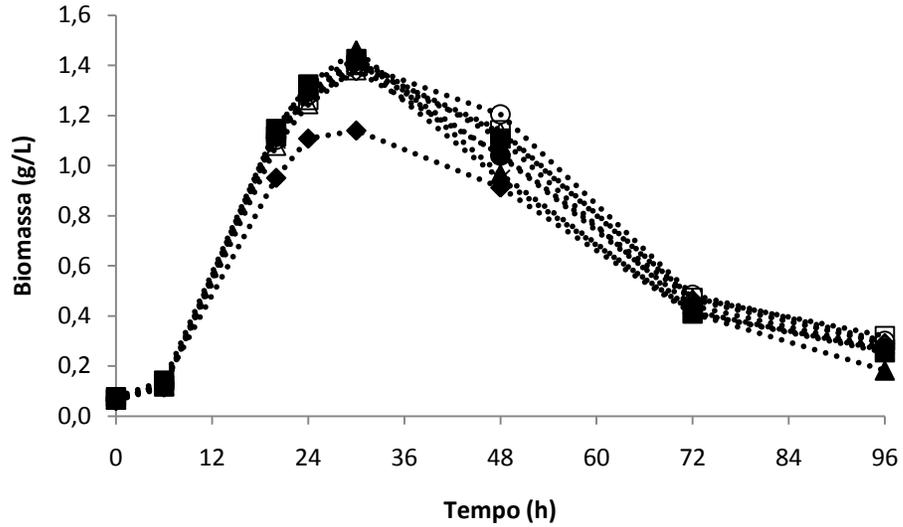


Figura 26. Perfil de crescimento celular do *L. pentosus* ATCC 8041 durante a fermentação em meio MRS_{xilose} com variação da concentração de peptona A. (◆) 0 g/L, (■) 1 g/L, (▲) 2 g/L, (●) 3 g/L, (⋈) 4 g/L, (○) 5 g/L, (◇) 6 g/L, (□) 7 g/L, (Δ) 8 g/L. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 96h).

Tabela 15. Concentrações de biomassa obtidas durante a fermentação em meio MRS contendo xilose com variação da concentração de Peptona A.

| Peptona A | Concentração (g/L) | | | | | | | | |
|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Tempo (h) | Biomassa (g/L) | | | | | | | | |
| 0 | 0,06±0,01 ^a | 0,08±0,03 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,07±0,02 ^a | 0,06±0,01 ^a | 0,07±0,00 ^a | 0,06±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a |
| 6 | 0,13±0,05 ^a | 0,14±0,04 ^a | 0,12±0,01 ^a | 0,13±0,03 ^a | 0,12±0,01 ^a | 0,12±0,01 ^a | 0,11±0,02 ^a | 0,12±0,01 ^a | 0,12±0,01 ^a |
| 20 | 0,95±0,14 ^a | 1,15±0,09 ^b | 1,15±0,01 ^b | 1,11±0,04 ^{ab} | 1,11±0,06 ^{ab} | 1,10±0,04 ^{ab} | 1,13±0,02 ^{ab} | 1,12±0,00 ^{ab} | 1,08±0,02 ^{ab} |
| 24 | 1,11±0,13 ^a | 1,32±0,06 ^b | 1,32±0,05 ^b | 1,30±0,04 ^b | 1,29±0,06 ^b | 1,28±0,03 ^{ab} | 1,27±0,02 ^{ab} | 1,26±0,05 ^{ab} | 1,25±0,05 ^{ab} |
| 30 | 1,14±0,19 ^a | 1,43±0,23 ^a | 1,46±0,07 ^a | 1,42±0,09 ^a | 1,41±0,10 ^a | 1,41±0,04 ^a | 1,38±0,08 ^a | 1,40±0,11 ^a | 1,38±0,04 ^a |
| 48 | 0,91±0,02 ^a | 1,11±0,17 ^a | 0,97±0,11 ^a | 1,04±0,11 ^a | 0,95±0,16 ^a | 1,20±0,22 ^a | 1,04±0,18 ^a | 1,14±0,16 ^a | 1,13±0,14 ^a |
| 72 | 0,41±0,04 ^a | 0,41±0,05 ^a | 0,41±0,03 ^a | 0,44±0,02 ^a | 0,42±0,01 ^a | 0,48±0,03 ^a | 0,46±0,02 ^a | 0,47±0,02 ^a | 0,47±0,01 ^a |
| 96 | 0,27±0,03 ^a | 0,25±0,03 ^a | 0,18±0,02 ^b | 0,27±0,01 ^a | 0,26±0,02 ^a | 0,30±0,02 ^a | 0,29±0,02 ^a | 0,32±0,05 ^a | 0,29±0,01 ^a |

a, b, c – Médias na mesma linha com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 apresentou capacidade de fermentar xilose em todas as concentrações de peptona A utilizadas. Para a utilização de 2, 4 e 8 g/L de peptona A o consumo de xilose foi em torno de 81% em 96 horas de cultivo, porém quando esta fonte de nitrogênio não foi utilizada no meio este consumo reduziu para 68%, apresentando a maior concentração de xilose residual (Figura 27, Tabela 16). Isto evidencia a influência da fonte de nitrogênio no consumo do substrato e sobre o crescimento do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 (Tabela 15). Observamos na Tabela 4 que a utilização de 2 ou 4 g/L de Peptona A não apresentam diferença estatística ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) para a concentração de xilose residual. Assim, pode-se utilizar a menor concentração, 2 g/L, desta fonte de nitrogênio visando diminuir o custo do meio.

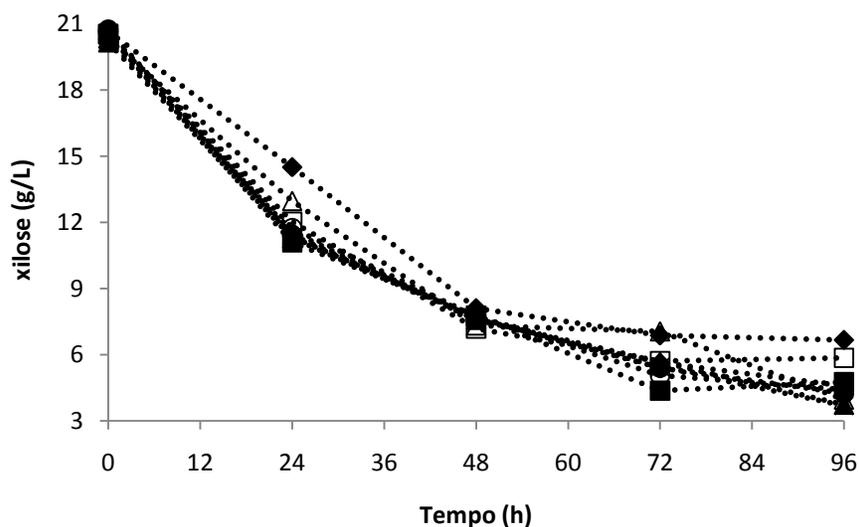


Figura 27. Consumo de xilose ao longo do período de fermentação em meio MRS_{xilose} com variação da concentração de peptona A. (◆) 0 g/L, (■) 1 g/L, (▲) 2 g/L, (●) 3 g/L, (⋈) 4 g/L, (○) 5 g/L, (◇) 6 g/L, (□) 7 g/L, (Δ) 8 g/L. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 96h).

Tabela 16. Concentrações de xilose durante a fermentação em meio MRS_{xilose} com variação da concentração de Peptona A.

| Peptona A | Concentração (g/L) | | | | | | | | |
|--------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Tempo (h) | Xilose (g/L) | | | | | | | | |
| 0 | 20,66±0,06 ^{ad} | 20,54±0,00 ^{ade} | 20,17±0,06 ^c | 20,74±0,06 ^d | 20,54±0,11 ^{abd} | 20,62±0,11 ^{abd} | 20,29±0,11 ^{bce} | 20,54±0,11 ^{abd} | 20,34±0,06 ^{abc} |
| 24 | 14,51±0,03 ^a | 11,10±0,00 ^b | 11,29±0,02 ^c | 11,42±0,01 ^d | 11,34±0,01 ^c | 11,74±0,02 ^e | 11,57±0,02 ^f | 12,03±0,01 ^g | 12,97±0,02 ^h |
| 48 | 8,11±0,01 ^a | 7,77±0,02 ^b | 7,59±0,01 ^c | 7,64±0,00 ^{ce} | 7,72±0,01 ^{bef} | 7,74±0,01 ^{be} | 7,61±0,02 ^{cf} | 7,19±0,03 ^d | 7,33±0,07 ^g |
| 72 | 6,88±0,02 ^a | 4,37±0,02 ^b | 5,68±0,05 ^c | 5,41±0,03 ^{de} | 5,44±0,04 ^e | 5,07±0,03 ^f | 5,64±0,04 ^c | 5,71±0,03 ^c | 7,06±0,01 ^g |
| 96 | 6,67±0,01 ^a | 4,76±0,04 ^b | 3,74±0,00 ^{ce} | 4,25±0,01 ^d | 3,69±0,02 ^e | 4,42±0,07 ^f | 4,59±0,00 ^g | 5,86±0,01 ^h | 3,97±0,00 ⁱ |

a, b, c, d, e, f, g, h, i – Médias na mesma linha com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O valor do pH apresentou uma redução expressiva para todas as concentrações de peptona A utilizadas e até mesmo sem a utilização da mesma. O pH partiu de 6,0 para 4,0, sendo a sua maior redução em 24 horas de cultivo (Figura 28). Isto pode evidenciar a formação de ácido durante a fermentação para todas as concentrações de peptona A utilizadas.

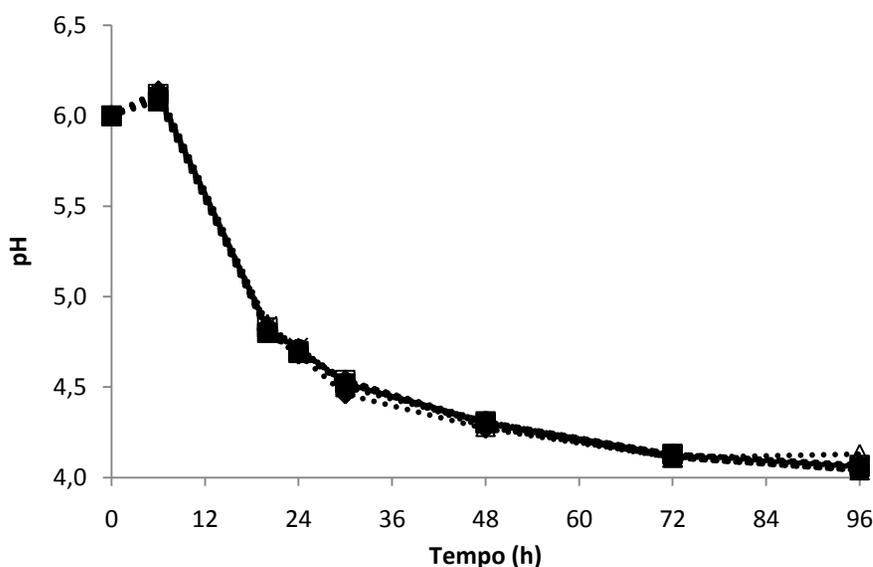


Figura 28. pH durante a fermentação em meio MRS_{xilose} com variação da concentração de peptona A. (◆) 0 g/L, (■) 1 g/L, (▲) 2 g/L, (●) 3 g/L, (⋈) 4 g/L, (○) 5 g/L, (◇) 6 g/L, (□) 7 g/L, (Δ) 8 g/L. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 96h).

5.6.2. Fermentação em meio MRS_{xilose} com substituição da peptona A por uréia

Pela Figura 29 pode-se observar que utilizando 8 g/L de peptona A, obtém-se a maior concentração de biomassa do *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 em 24 horas. Comportamento semelhante foi observado ao utilizar 2,74 g/L de uréia, porém atingindo a mesma concentração em 48 horas de cultivo. Possivelmente, este retardamento no crescimento celular foi provocado pela falta de nutrientes presentes na uréia, como aminoácidos e peptídeos, que podem ser encontrados na peptona A podendo favorecer

o crescimento da bactéria. Entretanto, a completa substituição da peptona A por uréia apresenta praticamente o mesmo efeito no crescimento bacteriano do que quando se utiliza somente a concentração de 8 g/L de peptona A (Tabela 17). Esta substituição por uréia torna o meio de cultivo mais econômico, pois o custo da uréia pode representar até 5% do custo da peptona A, dependendo da marca utilizada.

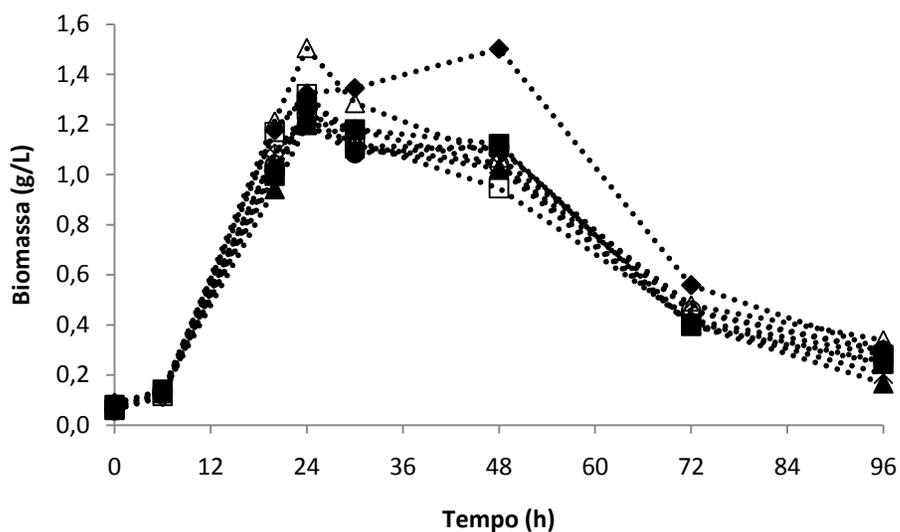


Figura 29. Perfil de crescimento celular do *L. pentosus* ATCC 8041 durante a fermentação em meio MRS_{xilose} com substituição da peptona A (P) por Uréia (U). (♦) 0 P + 2,74 U g/L, (■) 1 P + 2,4 U g/L, (▲) 2 P + 2,06 U g/L, (●) 3 P + 1,71 U g/L, (X) 4 P + 1,37 U g/L, (○) 5 P + 1,03 g/L, (◇) 6 P + 0,69 U g/L, (□) 7 P + 0,34 U g/L, (Δ) 8 P + 0 U g/L. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 96h).

Tabela 17. Concentrações de biomassa obtidas durante a fermentação em meio MRS_{xilose} com substituição da Peptona A por Uréia.

| | | Concentração (g/L) | | | | | | | |
|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Peptona A | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Uréia | 2,74 | 2,4 | 2,06 | 1,71 | 1,37 | 1,03 | 0,69 | 0,34 | 0 |
| Tempo (h) | Biomassa (g/L) | | | | | | | | |
| 0 | 0,09±0,01 ^a | 0,08±0,02 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,06±0,01 ^a | 0,06±0,00 ^a | 0,06±0,00 ^a | 0,06±0,01 ^a |
| 6 | 0,14±0,00 ^a | 0,14±0,01 ^a | 0,13±0,01 ^a | 0,13±0,02 ^a | 0,13±0,01 ^a | 0,13±0,01 ^a | 0,11±0,01 ^a | 0,12±0,01 ^a | 0,13±0,01 ^a |
| 20 | 1,18±0,02 ^{ac} | 1,00±0,02 ^{ab} | 0,94±0,08 ^b | 1,02±0,11 ^{abc} | 1,08±0,04 ^{abc} | 1,04±0,12 ^{abc} | 1,08±0,07 ^{abc} | 1,17±0,04 ^{ac} | 1,21±0,06 ^c |
| 24 | 1,32±0,04 ^a | 1,28±0,09 ^a | 1,20±0,09 ^a | 1,20±0,09 ^a | 1,25±0,03 ^a | 1,24±0,04 ^a | 1,22±0,04 ^a | 1,32±0,06 ^a | 1,50±0,04 ^b |
| 30 | 1,34±0,04 ^a | 1,18±0,14 ^a | 1,11±0,10 ^a | 1,09±0,09 ^a | 1,11±0,17 ^a | 1,18±0,17 ^a | 1,12±0,13 ^a | 1,13±0,27 ^a | 1,29±0,17 ^a |
| 48 | 1,50±0,16 ^a | 1,12±0,29 ^{ab} | 1,02±0,03 ^{ab} | 1,11±0,11 ^{ab} | 1,04±0,14 ^{ab} | 1,04±0,14 ^{ab} | 1,10±0,17 ^{ab} | 0,95±0,09 ^b | 1,07±0,30 ^{ab} |
| 72 | 0,56±0,02 ^a | 0,40±0,01 ^b | 0,40±0,04 ^{bc} | 0,41±0,05 ^{bc} | 0,41±0,02 ^{bc} | 0,46±0,01 ^{bc} | 0,45±0,01 ^{bc} | 0,42±0,04 ^{bc} | 0,48±0,02 ^c |
| 96 | 0,30±0,01 ^{ag} | 0,25±0,01 ^{bde} | 0,17±0,02 ^c | 0,25±0,01 ^{ef} | 0,20±0,03 ^{bc} | 0,30±0,02 ^{af} | 0,30±0,01 ^{af} | 0,28±0,02 ^{defg} | 0,34±0,01 ^a |

a, b, c, d, e, f, g – Médias na mesma linha com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 consumiu a xilose quase em sua totalidade, sendo seu maior consumo, em torno de 41 a 47%, durante as primeiras 24 horas de cultivo para todas as concentrações de peptona A e uréia. Quando a peptona A e uréia foram utilizadas separadamente o consumo de substrato foi em torno de 69% e 77%, respectivamente, em 96 horas de fermentação. Porém, quando a peptona A foi substituída pela uréia, o consumo de xilose aumentou entre 81% e 83% para as diferentes concentrações das fontes de nitrogênio utilizadas (Figura 30 e Tabela 18). A Tabela 18 mostra que a utilização de 6 g/L de peptona A e 0,69 g/L de uréia obteve-se a menor concentração de xilose residual, 3,40 g/L, e conseqüentemente o maior consumo de xilose, em 96 horas de cultivo. As concentrações de 1 g/L de peptona A com 2,4 g/L de uréia e 6 g/L de peptona A com 0,69 g/L de uréia diferem entre si ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Porém, como o valor do pH final para as duas condições são os mesmos (Figura 31), seria mais interessante utilizar a menor concentração da peptona A juntamente com a maior concentração de uréia, ou seja, 1 g/L de peptona A com 2,4 g/L de uréia, o que reduziria custo do meio de cultivo.

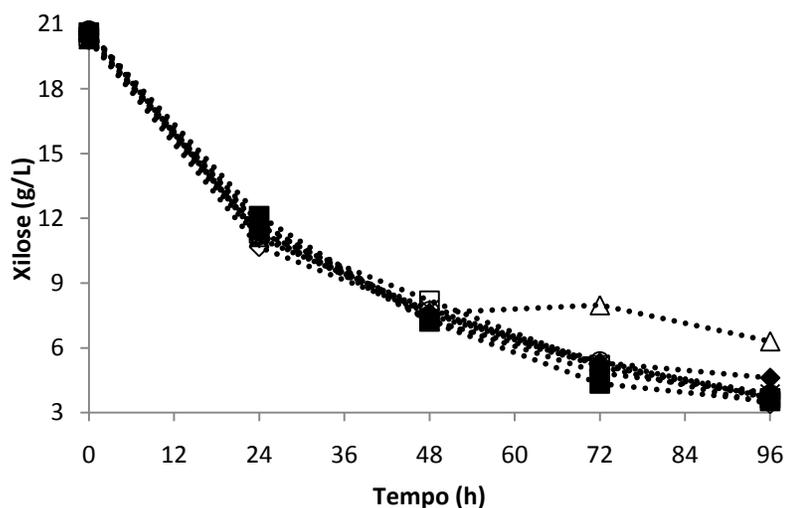


Figura 30. Consumo de xilose ao longo do período de fermentação em meio MRS_{xilose} com substituição da peptona A por uréia. (◆) 0 P + 2,74 U g/L, (■) 1 P + 2,4 U g/L, (▲) 2 P + 2,06 U g/L, (●) 3 P + 1,71 U g/L, (⋈) 4 P + 1,37 U g/L, (○) 5 P + 1,03 g/L, (◇) 6 P + 0,69 U g/L, (□) 7 P + 0,34 U g/L, (△) 8 P + 0 U g/L. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 96h).

Tabela 18. Concentrações de xilose durante a fermentação em meio MRS com substituição da Peptona A por Uréia.

| | | Concentração (g/L) | | | | | | | |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Peptona A | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Uréia | 2,74 | 2,4 | 2,06 | 1,71 | 1,37 | 1,03 | 0,69 | 0,34 | 0 |
| Tempo (h) | Xilose (g/L) | | | | | | | | |
| 0 | 20,34±0,06 ^{ab} | 20,62±0,00 ^{ab} | 20,29±0,11 ^a | 20,54±0,00 ^{ab} | 20,29±0,23 ^a | 20,70±0,11 ^{bc} | 20,25±0,06 ^a | 20,42±0,06 ^{ac} | 20,70±0,00 ^{bc} |
| 24 | 11,67±0,01 ^a | 12,11±0,02 ^b | 11,44±0,01 ^c | 11,76±0,01 ^d | 11,06±0,02 ^e | 11,23±0,03 ^f | 10,67±0,02 ^g | 11,31±0,02 ^h | 11,14±0,01 ⁱ |
| 48 | 7,51±0,03 ^{ac} | 7,22±0,02 ^a | 7,25±0,03 ^a | 7,30±0,06 ^{ad} | 7,79±0,04 ^c | 7,70±0,05 ^c | 7,61±0,20 ^{cd} | 8,19±0,05 ^b | 7,62±0,05 ^c |
| 72 | 5,32±0,03 ^{ad} | 4,35±0,01 ^b | 5,23±0,02 ^{ae} | 4,85±0,04 ^c | 5,24±0,02 ^{ae} | 5,37±0,01 ^d | 5,14±0,01 ^f | 5,20±0,03 ^{ef} | 7,98±0,01 ^g |
| 96 | 4,61±0,01 ^a | 3,54±0,02 ^b | 3,71±0,01 ^c | 3,84±0,01 ^d | 3,87±0,03 ^d | 3,69±0,01 ^c | 3,40±0,00 ^e | 3,67±0,01 ^c | 6,30±0,03 ^f |

a, b, c, d, e, f, g, h, i – Médias na mesma linha com letras iguais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O consumo de substrato foi acompanhado da redução de pH durante a fermentação, partindo de pH 6,0 para 3,9, sendo que seu período de estabilização iniciou-se em 48 horas de cultivo. O menor valor de pH foi encontrado para a concentração de 8 g/L de peptona A e 0 g/L de uréia. Para as demais concentrações os valores de pH se mantiveram em 4,0 (Figura 31).

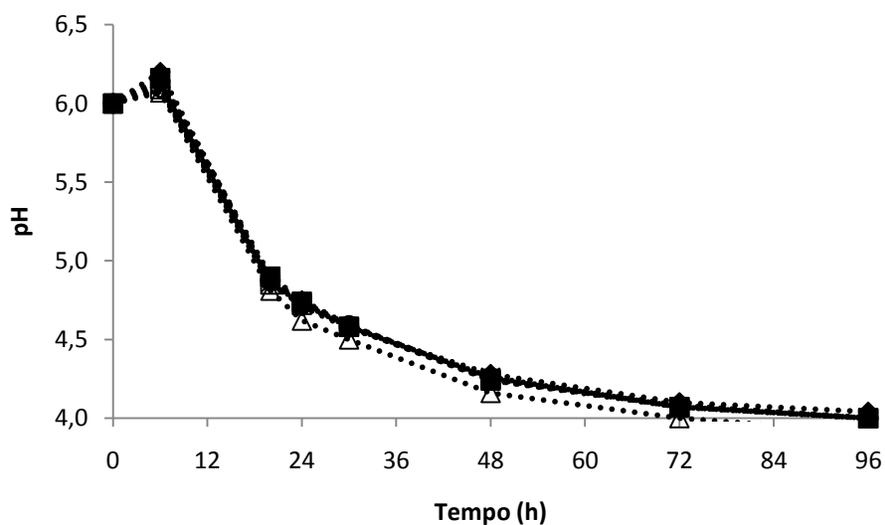


Figura 31. pH durante a fermentação em meio MRS_{xilose} com substituição da peptona A por uréia. (◆) 0 P + 2,74 U g/L, (■) 1 P + 2,4 U g/L, (▲) 2 P + 2,06 U g/L, (●) 3 P + 1,71 U g/L, (X) 4 P + 1,37 U g/L, (○) 5 P + 1,03 g/L, (◇) 6 P + 0,69 U g/L, (□) 7 P + 0,34 U g/L, (Δ) 8 P + 0 U g/L. (Condições: 30°C, 150 rpm, pH 6,0, 96h).

6. CONCLUSÃO

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, um resíduo agroindustrial sub-utilizado pela rota biotecnológica, pode ser usado para obtenção de soluções de açúcares pela hidrólise química ou enzimática, que depois da suplementação com nutrientes adequados pode ser utilizado para converter eficientemente açúcares hemicelulósicos em ácido láctico por algumas espécies de bactérias ácido lácticas.

Os testes preliminares realizados visando selecionar microrganismos capazes de assimilar xilose para produção de ácido em meio sólido, utilizando os indicadores de pH verde de bromocresol e púrpura de bromocresol indicaram que todos os microrganismos, com exceção do *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* ATCC 7830, foram capazes de utilizar os componentes do meio para a produção de ácido.

Nos experimentos realizados em frascos do meio MRS_{xilose}, o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 foi capaz de assimilar xilose quase que em sua totalidade, destacando-se por apresentar alta conversão de substrato de 92% e bom rendimento de ácido de 0,85 g/g (acidez total titulável em termos de ácido láctico), sendo selecionado como o microrganismo com potencial para aplicação no processo.

A fermentação do meio MRS na ausência de xilose mostrou que o *L. pentosus* pode produzir ácido acético a partir dos componentes presentes no meio, como a peptona animal, extrato de levedura e peptona de soja, mesmo com a limitação de substrato imposta pelo meio, tendo atingido a concentração de 4,91 g/L deste ácido e uma concentração de biomassa em torno de 0,9 g/L.

O experimento em batelada simples do meio MRS_{xilose} apresentou um rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,58 g/g de ácido láctico com concentração final de 11,68 g/L e a máxima produtividade volumétrica (Q_P) de 0,24 (g/[L.h]) alcançada em 48 horas de fermentação. O ácido acético foi produzido em concentração similar à atingida para o ácido láctico, sendo de 13,06 g/L, provavelmente devido à composição do meio que pode ter incrementado a produção deste ácido orgânico,

assim como já observado na fermentação do meio MRS na ausência de xilose. Assim, foi considerado que 8,15 g/L de ácido acético foram produzidos a partir do substrato, com rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,40 g/g, e 4,91 g/L a partir de outros componentes do meio como extrato de levedura e peptonas. Foram produzidos 62% da forma isomérica D(-)- ácido lático.

Na fermentação do meio MRS_{ALB} foi possível observar que o *L. pentosus* ATCC 8041 pode fermentar eficientemente pentoses (xilose e arabinose) na presença de glicose. O microrganismo adaptou-se eficientemente ao meio, não apresentando inibição pelo substrato, produzindo 1,14 g/L de biomassa com $\mu_{\text{máx}}$ de 0,103 h⁻¹ atingida em 4 horas de fermentação. A concentração final de 2,37 g/L de ácido lático representou um rendimento de produto ($Y_{P/S}$) de 0,65 g/g e a máxima produtividade volumétrica (Q_P) atingida foi de 0,23 g/[L.h], sendo produzidos 66% da forma isomérica D(-)-ácido lático. O rendimento de ácido acético ($Y_{P/S}$) foi de 0,27 g/g com concentração final de 0,99 g/L.

O *Bacillus coagulans* 162 apresentou melhor rendimento de ácido lático ($Y_{P/S} = 0,85$ g/g) e produtividade ($Q_S = 0,35$ g/[L.h]) em relação ao *L. pentosus* ATCC 8041 quando o MRS_{ALB} foi utilizado como meio de fermentação. A velocidade específica de crescimento (μ_x) de 0,199 h⁻¹ do *B. coagulans* 162 foi maior que a atingida pelo *L. pentosus* ATCC 8041 de 0,103 h⁻¹ durante o mesmo período de tempo, 4 horas. O *Bacillus coagulans* 162 apresentou a máxima taxa volumétrica de consumo de substrato (Q_S) de 0,41 g/[L.h] inferior à alcançada pelo *L. pentosus* ATCC 8041, que foi de 0,44 g/[L.h], porém num menor período de tempo, em 2 horas de cultivo.

Foi observado na fermentação em batelada do meio MRS_{HBC} que o *L. pentosus* ATCC 8041 apresentou grande habilidade em fermentar os açúcares hemicelulósicos com bom crescimento celular e total assimilação do substrato em 20 horas de fermentação, sem apreciável inibição. Foram produzidos 10,6 g/L de biomassa atingindo um $\mu_{\text{máx}}$ de 0,17 h⁻¹ em 2 horas de fermentação. O perfil de consumo de substrato mostrou que a glicose foi o primeiro açúcar a ser esgotado, seguido de xilose e arabinose. A produção de 28,99 g/L de ácido lático representou um rendimento de ($Y_{P/S}$) de 0,78 g/g e alcançando a máxima

produtividade volumétrica (Q_P) de 1,99 g/[L.h] em 10 horas de cultivo. Foram produzidos cerca de 53% da forma isomérica D(-)-ácido lático. O ácido acético, principal subproduto da fermentação, apresentou um rendimento ($Y_{P/S}$) de 0,21 g/g com concentração final de 8,19 g/L e a máxima produtividade volumétrica (Q_P) de 0,33 g/[L.h] foi atingida em 24 horas de fermentação. A produção de ácido acético iniciou em 10 horas de cultivo, logo após o consumo total de glicose, mostrando que a co-produção de ácido acético é originada do metabolismo de xilose e arabinose. Foi possível observar que na ausência de glicose a via do *L. pentosus* muda de homo para heterofermentativa, sendo este microrganismo considerado um organismo facultativamente heterofermentativo, degradando hexoses (glicose) via Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) e pentoses (xilose e arabinose) via Fosfoquetolase (PK).

O *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 foi capaz de se desenvolver em meio MRS_{xilose} na ausência de peptona A, apresentando uma redução de pH 6,0 para 4,0 indicando a formação de ácido mesmo sem a utilização desta fonte de nitrogênio. A substituição de peptona A por uréia apresenta maior influência em relação ao consumo de xilose do que quanto ao crescimento celular, pois a maior assimilação de xilose se apresentou na substituição destes componentes do que quando os mesmos foram utilizados separadamente. A substituição da peptona A por uréia seria uma vantagem no que diz respeito à redução do custo do meio de cultura e conseqüentemente na produção de ácido lático.

Os rendimentos de produto e produtividades das fermentações dos meios MRS_{ALB} e MRS_{HBC} foram maiores do que os obtidos em meio sintético. Pelos resultados apresentados, o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor pode ser considerado uma matéria-prima promissora para a realização de processos de bioconversão representando uma fonte potencialmente barata e renovável de açúcares fermentescíveis.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Realizar estudos da substituição dos nutrientes por outras fontes de nitrogênio mais baratas visando obter uma suplementação mais econômica e diminuir os custos de processo;
- ✓ Realizar experimentos de inibição pelo substrato e componentes do meio MRS_{HBC} visando conhecer a máxima concentração inicial de açúcares suportada pelo microrganismo;
- ✓ Realizar experimentos de inibição pelo produto com o objetivo de conhecer a máxima concentração de ácido lático suportada pela bactéria;
- ✓ Realizar estudos em batelada alimentada visando aumentar o rendimento de produto;
- ✓ Testar outras cepas de bactérias lácticas com potencial para a produção de ácido lático a partir do hidrolisado e/ou água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, utilizando o *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 como referência levando-se em conta critérios como temperatura de fermentação, produtividade e exigência nutricional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M.; VARMA, A.J.; GOKHALE, D.V. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. *Green Chem.*, v. 9, p. 58-62, 2006.

BARBOUR, E.A.; PRIEST, F.G. The preservation of lactobacillus : A comparison of three methods. *Letters and Appl Microbiol.*, v. 2, p. 69-71, 1986.

BAUDEL, H.M.; ZAROR, C.; DE ABREU, C.A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Industrial Crops and Products.*; v. 21; p. 309-315; 2005.

BETANCUR, G.J.V. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part. I: Diluted acid pretreatment optimization. *Electronic J. Biotechnol.*; v.13; n° 3; p. 1-9; 2010.

BONARTSEV, A.P.; MYSHIKINA, V.L.; NIKOLAEVA, D.A.; FURINA, EK.; MAKHINA, T.A.; LIVSHITS, V.A.; BOSKHOMDZHIEV, A.P.; IVANOV, E.A.; IORDANSKII, A.L.; BONARTSEVA, G.A. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrato) and its copolymers – natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. *Communic. Curr Res. Edu. Top. Trends Appl. Microbiol.*, p. 295-3007, 2007.

BUSTOS, G.; MOLDES, A.B.; CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M. Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.*, v. 84, p. 2105-2112, 2004.

BUSTOS, G.; MOLDES, A.B.; CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M. Influence of metabolism pathway on lactic acid production from hemicellulosic trimming vine shoots hydrolysates using *Lactobacillus pentosus*. *Biotechnol. Prog.*, v. 21, p. 793-798, 2005.

BUSTOS, G.; MOLDES, A.B.; CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M. Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolizates trough continuous production lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus*. *J. Food Eng.*, v. 78, p. 405-412, 2007.

BRUGNAGO, R.J.; SATYANARAYANA, K.G.; WYPYCH, F.; RAMOS,L.P. The effect of steam explosion on the production of sugarcane bagasse/ polyesters composites. *Composites: Part A*, v. 42, p. 364-37, 2011.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F., SILVIA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO,W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Revista Analítica*, nº 44, p. 48-91, 2009.

CARA, C.; RUIZ, R.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Prduction of fuel etanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, v. 87, p. 692-700, 2008.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Biores. Technol.*, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CAVIN, J.F.; PREVOST, H.; LIN, J.; SCHIMITT, P.; DIVIES, C. Medium for Screening *Leuconostoc oenos* Strains Defective in Malolactic Fermentation. *Appl Environm Microbiol.*, p. 751-753, 1989.

CHAMPE, P.C., HARVEY, FERRIER, D.R. Biochemistry. 3^a ed., 2005, Cap. 13: *Pentose phosphate pathway and NADPH*, p. 143-154.

CONTRERAS, A.M.; ROSA, E.; PÉREZ, M.; LANGENHOVE, H.V.; DEWULF, J. Comparative life cycle assessment of four alternatives for using by-products cane sugar production. *J. Clean. Product.*, v. 17, p. 772-779, 2009.

COOPERSUCAR. Fundamentos dos processos de fabricação de açúcar e álcool. Caderno coopersucar, 1988.

CORTEZ, L.A.B; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. Biomassa para energia. In: FINGUERUT, J.; MEIRELLES, A.J.A.; GUIARDELLO, R.; COSTA, A.C., 2008. Cap. 13: *Fermentação, hidrólise e destilação*, p. 435-473.

CORTEZ, L.A.B. Bioetanol de cana-de-açúcar. P & D para produtividade e sustentabilidade. In: WALTER, A., 2010. Part. 4, Cap. 5: *workshop potencial de geração de eletricidade a partir da biomassa residual da cana: oportunidades, desafios e ações necessárias – Relatório final*, p. 577-582.

DAESCHEL, M.A.; McFEETERS, R.F.; FLEMING, H.P.; KLAENHAMER, T.R.; SANOZKY, R.B. Mutation and selection of *Lactobacillus plantarum* strains that do not produce carbon dioxide from malate. *Appl. Enviromen. Microbiol.*, v. 47, n° 2, p. 419-420, 1984.

DUMBREPATIL, A.; ADSUL, M.; CHAUDHARI, S.; KHIRE, J.; GOKHALE, D. utilization of molasses sugar of lactic acid production by *Lactobacillus delbruekii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in Batch Fermentation. *Appl. Enviromen. Microbiol.*, v. 74, n° 1, p. 333-335, 2008.

EUBELER, J.P.; BERNHARD, M.; KNEPPER, T.P. Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *Trends in analytical chemistry*, v. 29, n° 1, p. 84-100, 2010.

FRANCHETTI, S.M.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quim. Nova*, v. 29, n° 4, 811-816, 2006.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

GARDE A.; JONSSON G.; SCHIMIDT A. S.; AHRING B.K. Lactic acid production from wheat straw hemicelulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour. Technol.*, v. 81, p. 217-223, 2002.

GARLOTTA, D. A literature review of poly (lactic acid). *J. of Polym. and the enviromen.*, v. 9, n ° 2, p. 63-84, 2002.

GIVRY, S.; PREVOT, V.; DUCHIRON, F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolysate by cells of *Lactobacillus bifementans* immobilized in Ca-alginate using responde surface methodology. *J. Microbiol Biotechnol.*, v. 24, p. 745-752, 2008.

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 16, p. 57-69, 2005.

HASSAN, M.A.; AMARA, A.A.; ABUELHAMD, A.T.; HAROUN, B.M. Leucocytes show improvement growth on PHA polymer surface. *Pak. J. Pharm. Sci.*, v. 23, n° 3, p. 332-336, 2010.

HAULY, M.C.O; OLIVEIRA, A.R.de; OLIVEIRA, A.S. de. Lactic acid production by *L. curvatus* in sugarcane molasses. *Sem. Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, n° 1, p. 133-142, 2003.

HEERAH, A.S.; MUDHOO, A.; MOHEE, R.; SHARMA, S.K. Steam pre-treatment of lignocellulosic waste for biomethanogenesis: a preliminary study. *Rasayan J. Chem.*, v. 1, n° 3, p. 503-514, 2008.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enz. and Microbiol. Technol.*, v. 26, p. 87-107, 2000.

IYER, P.V.; THOMAS, S.; LEE, Y.Y. High yield fermentation of pentoses into of lactic acid. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 84-86, 2000.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnol. Advan.*, v. 27, p. 145-152, 2009.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v.74, p. 524-534, 2007.

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.*; v. 41, p. 759-763, 2006.

KADAM, S.R.; PATIL, S.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process. Biochem.*,v. 41, p. 120-126, 2006.

KARP, S.G.; IAGASHIYAMA, A.H.; SIQUEIRA, P.F.; CARVALHO, J.C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, V.T.; CORAL, J.; THOLOZAN, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Application of the biorefinery concept to produce L-

lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilote scale. *Bioresour. Technol.*, v. 112, p. 1765-1772, 2011.

KIM, M.; AITA, G.; DAY, D.F. Compositional changes in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 161, p. 34-40, 2010.

KIMURA, Y. Molecular, structural and material design of bio-based polymers. *Polym. J.*, v. 41, p.797-807, 2009.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, p. A-Q, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 377-391, 2008.

LANZOTTI, C.R. Uma análise energética de tendências do setor sucroalcooleiro. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas- SP. 2000.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 1036-1046, 2010.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2^a ed., 1995.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.69, p. 627-642, 2006.

LI, Y.; VENKATESHAN, K.; SUN, X.S. Mechanical and thermal properties, morphology and relaxation characteristics of poly (lactic acid) and soy flour/wood flour blends. *Polym. Int.*, v. 59, p. 1099-1109, 2009.

LITCHFIELD, J.H. Lactic acid, Microbially produced. *Appl. Microbiol.*, p. 362-372, 2009.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. *Sustain. Biotechnol.*, p. 211-228, 2010.

LIU, S.; SKINNER-NEMEC, K.A.; LEATHERS, T.D. Lactobacillus buchneri strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 75-81, 2008.

LOPES, A.R. *Produção de ácido lático por Lactobacillus em diferentes meios de cultivo*. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2008.

LUIZ-TÉLLEZ, S.J.; MOLDES, A.B.; ALONSO, J.L.; VÁZQUEZ, M. Optimization of lactic acid production by Lactobacillus delbrueckii through response surface methodology. *J. of Food and Science*; v. 68; n°4; p. 1454-1458; 2003.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento): banco de dados. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 04 fev. 2011.

MARQUES, S.; SANTOS, J.A.L.; GÍRIO, F.M.; ROSEIRO, J.C. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochem. Engineer. J.*; v. 41; p. 210-216; 2008.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HÄRGERDAL, B.H.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. and Microbiol. Technol.*; v.31; p. 274-282; 2002.

MOLDES, A.B.; TORRADO, A.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Appl Biochem and Biotechnol*, v. 135, p. 219-227, 2006.

MIRANDA, I.C. *Aproveitamento energético a partir de resíduos de biomassa: Bagaço e palha de cana-de-açúcar*. 199f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro-RJ. 2009.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; SRIVASTAVA, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Eletron. J. Biotechnol.*, nº2, v. 7, p. 167-179, 2004.

NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Biochemistry*, Washington, v. 153, p. 375-380, 1944.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; MADZINGAIDZO, L., MIYAFUJI, H.; THOMASSER, C. Lignocellulose feedstock for the production of lactic acid. *Chem. Biochem. Eng.*, nº18, v. 1, p. 55-63, 2004.

OHARA, H.; OWAKI, M.; SONOMOTO, K. Calculation of metabolic flow of xylose in *Lactococcus lactis*. *J. of Bioscienc. and Bioeng.*, v. 103, p. 92-94, 2007.

ONYARI, J.M.; MULAA, F.; MUIA, J.; SHIUNDU, P. Biodegradability of poly (lactic acid), preparation and characterization of PLA/Gum Arabic blends. *J. Polym. Environ.*, v. 16,p. 205-212, 2008.

OTARI, S.V.; GHOSH, J.S. Production and characterization of the polymer polyhydroxy butyrate-co-polyhydroxy valerate by *Bacillus megaterium* NCIM 2475. *Curr. Res. J. Biol. Sci.*, 1, v. 2, p. 23-26, 2009.

PAIVA, J.E. de.; MALDONADE, I.R.; SCAMPARINI, A.R.P. Xylose production from sugarcane bagasse by surface response methodology. *Rev. Brasileira de Eng. Agrícola e Ambiental*, v. 13, n° 1, p. 75-80, 2009.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residue. I: *Sugarcane bagasse*. *Bioresour. Technol*, v. 74, p. 69-80, 2000.

PAPAGEORGIU, G.Z.; BESLIKAS, T.; GISGIS, J.; CHRISTOFORIDES, J.; BIKIARES, D.N. Crystallization and enzymatic hydrolysis of PLA grade for orthopedics. *Advan. Poly. Technol.*, v. 29, n° 4, p. 280 – 299, 2010.

PATEL, M.A.; OU, M.S.; HARBRUCKER, R.; ALDRICH, H.C.; BUSZKO, M.L.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. Isolation and characterization of acid-tolerant , thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl. and Envirom. Microbiol.*; v.72; n° 5; p. 3228–3235, 2006.

PATEL M.; OU M.; INGRAM L.O.; SHANMUGAN K.T. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.*, v. 26, p. 865-868, 2004.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Techonol. Manag. Innov.*; v.2; p. 118-126; 2007.

PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I.C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R.R.; FILHO, S.O.; PENNA, T.C.V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 121-124, p. 59-70, 2005.

PICATAGGIO, S.K.; ZHANG, M.; FRANDEN M.A.; MCMILLIAN J.D.; FINKELSTEIN, M. *Recombinant lactobacillus for fermentation of xylose to lactic acid and lactate*. US patent, 1998; 5,798,237.

PIPPO, W.A.; LUENGO, C.A.; KOEHLINGER, J.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Sugarcane energy use: The Cuban use. *Energy Policy*, v. 36, p. 2163-2181, 2008.

PHILIP, S.; KESHARVASZ, T.; ROY, I. Review polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 82, p. 233-247, 2007.

PUPULIN, R.P. Sistema de apoio para programação de colheita em usina de cana-de-açúcar. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas- SP. 2010.

RABELO, S.C. *Avaliação do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar*. 180f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas- SP. 2007.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosics materials. *Quim. Nova*; v. 26, n° 6, 863-871, 2003.

RASAL, R.M.; JANORKAR, A.V.; HIRT, D.E. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*; v. 35; p. 338-356; 2010.

RATTANACHOMSRI, U.; KANOKRATANA, P.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y.; CHAMPREDA, V. Culture-independent phylogenetic analysis of the microbial community in industrial sugarcane bagasse feedstock piles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 75, n°2, p. 232-239, 2011.

RAY, R.C.; SHARMA, P.; PANDA, S.A. Lactic acid production from cassava fibrous residue using *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *J. Environ. Biol.*, v. 30, n°5, p. 847-852, 2009.

RAWN, J.D. *Biochemistry*. In: *Catabolism of amino acids and the urea cycle*. 1^a ed. (Int. ed.), chapter 17, p. 457-487, 1989.

REDDY, G., ALTAF, Md.; NAVEENA, B.J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E.V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. *Biotechnol. Advanc.*, v.26, p- 22-34, 2008.

RFA (Renewable Fuels Association). Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-85.9-billion-litres-22.7-billion-ga/>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

RIVERA, O.M.P.; TORRADO, A.M.; MOLDES, A.B.; DOMÍNGUEZ, J.M. Minerals and organic nitrogen present in grape marc hydrolysates enhance xylose consumption by *Lactobacillus pentosus*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 152, p. 262-274, 2009.

RIVERA, O.M.P.; MOLDES, A.B.; TORRADO, A.M.; DOMÍNGUEZ, J.M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. *Process. Biochem.*, v. 42, p. 1010-1020, 2007.

ROJAN, P.J.; NAMPOOTHIRI, K.M.; NAIR, A.S.; PANDEY, A. L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.*, v. 27, p. 1685-1688, 2005.

RUDEEKIT, Y.; NUMNOI, J.; TAJAN, M.; CHAIWUTTHINAN, P.; LEEJARKPAI, T. Determine biodegradability of polylactic acid under different environments. *J. Metals, Materials and Minerals*, v. 18, n° 2, p. 83-87, 2008.

SABIR, M.I.; XU, X.; LI, L. A review of biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J. Mater. Sci.*, v. 44, p. 5713-5724, 2009.

SATYANARAYANA, K.G.; ARIZAGA, G.G.C.; WYPYCH, F. Biodegradable composites based on lignocellulosic fibers – An overview. *Progres. Polym. Sci.*, v. 34, p. 982-1021, 2009.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quim. Nova*, v. 32, n° 3, 661-667, 2009.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; LEITÃO, V.F.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Biores. Technol.*, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Potential of solid state fermentation for production of L (+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, v. 41, p. 286-290, 1994.

SHEN, L.; WORREL, E.; PATEL, M. Perspective: Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* V.4, p. 25-40, 2010.

SOMOGYI, M.A. A new reagent for determination of sugar. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.

STAVRINIDRES, A.J.; PHIPPS, D.A.; AL-SHAMMA'A, A. Review; current and developing lignocellulosic pretreatment methods for bioethanol production. *Amended Proceedings Bean Web Version*, p. 233-242, 2010.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUGARCANECROPS. Growth morphology. Disponível em: <http://www.sugarcane crops.com/p/growth_morphology/>. Acesso em Abr. 2011.

TANAKA, K.; KOMIYAMA, A.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A.; HALL, S.J.; STANBURY, P.F. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; v. 60 p. 160-167; 2002.

TANIGUCHI, M.; TOKUNAGA, T.; HPRIUCHI, K.; HOSHINO, K.; SAKAI, K.; TANAKA, T. Production of lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 66, p. 160-165, 2004.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Boiresources 2*, v. 4, p. 707-738, 2007.

THOMAS, S. Production of lactic acid from pupl mill solid waste and xylose using *Lactobacillus delbrueckii* (NRRL B-445). *Appl Biochem and Biotechnol*, v. 84-86, p. 455-468, 2000.

TRIANA, O., LEONARD, M., SAAVEDRA, F., *et al.* *Atlas: Del bagazo de la caña de azucar*. México, GEPLACEA, 143p, 1990.

TYREE, R.W.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. The fermentative characteristics of lactobacillus xylosus on glucose and xylose. *Biotechnol. Lett.*, v. 12, nº1, p. 51-56, 1990.

UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar): Banco de dados, no ar desde 1997. Disponível em <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 04 fev. 2011.

VENUS, J.; IDLER F., ALBRECHT C. New ways o selecting lactic acid bacteria for biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 37, p. 240-243 1992.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v. 22, nº2, p. 245-264, 2008.

VODNAR, D.C.; VENUS, J.; SCHNEIDER, R.; SOCACIU, C. Lactic acid production by *Lactobacillus paracasei* 168 in discontinuous fermentation using Lucerne green juice as nutrient substitute. *Chem. Eng. Technol.*, v. 33, nº 3, p. 468-474, 2010.

XIAODONG, W.; XUAN, G. RAKSHIT, S.K. Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotechnol. Lett.*, v. 19, nº9, p. 841-843, 1997.

WALTON, S.L.; BISCHOFF, K.M.; VAN HEININGEN, A.R.P.; VAN WALSUM, G.P. Production of lactic acid extracts by *Bacillus coagulans* MXL-9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 37, p. 823-830, 2010.

WANG, L. WANG, Z.H.; SHEN, C.Y.; YOU, M.L.; XIAO, J.F. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grow in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. *Biomater.*, v. 31, p. 1691-1698, 2010.

WEE, Y.J; KIM, J.N; HYU, H.W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol*, v. 44, p. 163-172, 2006.

WENG, Y.X.; WANG, X.L.; WANG, Y.Z. Biodegradation behavior of PHAs with chemical different structure under controlled composting conditions. *Polym. Test.*, v. 30; p. 372-380, 2011.

WILLIAMS, S.F., MARTIN, D.P.; HOROWITZ, D.M.; PEOPLES, O.P. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 25, p. 111-21, 1999.

WU, C. - S. Renewable resource-based composites of recycled natural fibers and maleated polylactide bioplastic: Characterization and biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, p. 1076-1084, 2009.

WRIGHT, L. Worldwide commercial development of bioenergy with a focus on energy crop-based projects. *Biomass and bioenergy*, v. 30, p. 706-714, 2006.

XU, Z.; WANG, Q.; WANG, P.; CHENG, G.; JI, Y.; JIANG, Z. Production of lactic acid from soybean stalk hydrolysate with *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus casei*. *Process Biochem.*, v. 42, p. 89-92, 2007.

ZHANG, J.; XU, J.; WANG, H.; JIN, W.; LI, J. Synthesis of multiblock thermoplastic elastomers based on biodegradable poly (lactic acid) and polycaprolactone. *Mater. Sci. Eng.*, v. 29, p. 889-893, 2009.

ZHANG, X.; ESPIRITU, M.; BILYK, A.; KURNIAWAN, L. Morphological behavior of poly (lactic acid) during hydrolytic degradation. *Polym. Degrad. Stabil.*, v. 93, p. 1964-1970, 2008.

ZHU, Y.; LEE Y.Y.; ELANDER R.T. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation. *Appl Biochem and Biotechnol*, v. 136-140, p. 722-737, 2007.