



GISELLE DE ARRUDA RODRIGUES

“PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO  
BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR”

CAMPINAS  
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

GISELLE DE ARRUDA RODRIGUES

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO  
BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR

Orientadora: Profa Dra Telma Teixeira Franco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA GISELLE DE ARRUDA RODRIGUES  
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. TELMA  
TEIXEIRA FRANCO**

**Prof. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientadora)**

CAMPINAS

2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

R618p Rodrigues, Giselle de Arruda  
Produção de ácido láctico a partir do bagaço da cana-  
de-açúcar / Giselle de Arruda Rodrigues. --Campinas,  
SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Telma Teixeira Franco.  
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácido láctico. 2. Bagaço da cana. 3. Bacillus  
(Bacteria). 4. Tratamento térmico. I. Franco, Telma  
Teixeira, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Production of lactic acid from sugar cane bagasse

Palavras-chave em Inglês: Lactic acid, Sugar cane bagasse, Bacillus, Thermal treatment

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Jonas Contiero, Adilson Roberto Gonçalves, Carlos Eduardo Vaz  
Rossell, Gabriela Alves de Macedo

Data da defesa: 31-07-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

CAMPINAS

2012

iv

Giselle de Arruda Rodrigues

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DO  
BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS COMO  
REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTORA EM ENGENHARIA QUÍMICA.  
APROVAÇÃO EM 31/07/2012.



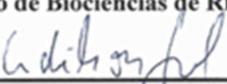
---

Prof. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientadora)  
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP



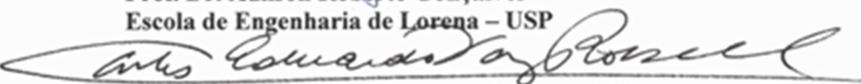
---

Prof. Dr. Jonas Contiero  
Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP



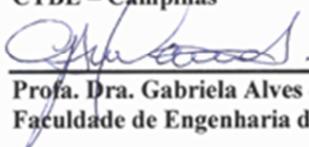
---

Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves  
Escola de Engenharia de Lorena - USP



---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell  
CTBE - Campinas



---

Prof. Dra. Gabriela Alves de Macedo  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

CAMPINAS  
2012

# DEDICATÓRIA

A meu pai,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

A professora Telma pela confiança e oportunidade concedida.

Ao Dr. Joachim Venus e família pela cordialidade e generosidade.

Aos professores Adilson Roberto Gonçalves, Jonas Contiero, Carlos Eduardo Vaz Rossell e Gabriela Alves de Macedo pela atenção e paciência na correção dos textos.

À Professora Lucimara Gaziola de La Torre pelos ensinamentos e exemplo de fé.

Ao Dr. Fernando Frederico pela paciência e solicitude na realização das análises cromatográficas.

Ao Rodrigo por todo amor, respeito e dedicação que me presenteia todos os dias.

Ao Sr. Leonildo e D. Ana pelo carinho e hospitalidade.

Sou especialmente grata ao amigo Haroldo Yukio Kawaguti, pelos conselhos e apoio sempre presente.

A minha amiga de sempre, Joelise, pelo carinho e cumplicidade.

A minha amiga Cecília Sulzbacher Caruso pelo companheirismo incondicional.

A Dra. Ana Carolina Deckmann pela inspiração.

A Dra. Kitty pela gentileza e sabedoria compartilhados.

A Rosângela pela competência e presteza, sempre.

A D. Lourdes, D. Maria e Fabiana pelo zelo com todos nós, alunos da FEQ.

Aos meus amigos da FEQ por se tornarem minha família nestes últimos anos, Bianca, Michelle, Vini, Andréia, Olga, Jaiver, Érika, Edison, Liliana, Verônica, Alessandro, Talita, Eulália, Anna e Toni.

A los Hermanos, Oscar e Sérgio, pela convivência e pelas alegrias compartilhadas.

Aos meus amigos-colegas do Laboratório de Bioconversão do Departamento de Bioengenharia do ATB, em Potsdam, Roland, Kerstin Mehlmann, Kerstin Mundt, Annegret, Lars, Jonas, Sigrid e Andreas.

À querida Frau Rehde pelas análises e pela *Fahrrad*.

Aos amigos doutorandos Dan, Danna, Ingo Bergmann, Ingo Baumstark, Antje, Mandy, Kingslay e Ali. Aos estagiários Stefan, Michell e Razhan pelos momentos de alegria e descontração.

Ao Dr Scholz pelo carinho e receptividade.

A minha querida amiga Svetlana Anfimova e seu esposo Sascha Rieger, pelo amor fraterno e por todos os momentos de alegria que desfrutamos.

Ao meu querido amigo Fatih Giriskan e sua amorosa família.

Aos amigos da UniPotsdam, Kevin, Josnella, Daniel e Dimitri.

À família Rocha pelo carinho e acolhimento que nunca me deixaram faltar.

A minha mãe, minhas irmãs e meus sobrinhos por todo amor que partilhamos.

A Deus, por ter colocado todas estas pessoas na minha vida.

## MENSAGEM

*“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.*

*E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.*

*Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”*

***Cora Coralina***

## RESUMO

**RODRIGUES, G.A.** Produção de ácido láctico a partir do bagaço da cana-de-açúcar. Campinas: UNICAMP, Julho de 2012, 177 páginas. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Departamento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

A produção de compostos químicos a partir de resíduos lignocelulósicos tem atraído bastante a atenção da sociedade atual. A busca por alternativas produtivas não dependentes de combustíveis fósseis, o uso de fontes renováveis e a sustentabilidade são os principais motivos. Neste trabalho, a produção do ácido láctico por fermentação dos açúcares obtidos do bagaço da cana de açúcar, essencialmente glicose e xilose, foi estudada.

Partindo de várias cepas de bactérias ácido lácticas e utilizando-se metodologia qualitativa, 26 linhagens foram selecionadas para testes em frascos agitados e em biorreator. Os melhores resultados foram obtidos em fermentações utilizando-se *B. coagulans* 162, alcançando rendimento de 0,95 e produtividade volumétrica de  $2,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em regime de batelada simples e meio de cultivo contendo glicose, xilose e arabinose. Em alimentação contínua, o meio de cultivo alcançou 105 g de ácido láctico por litro de meio fermentado.

Os efeitos dos tratamentos de hidrólise térmica e explosão a vapor do bagaço da cana de açúcar também foram estudados. Verificou-se a formação de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) e liberação dos açúcares glicose, xilose e arabinose. As fibras do bagaço foram fotografadas utilizando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV), antes e após tratamentos térmicos, para observação das modificações no arranjo da estrutura original.

O bagaço *in natura*, contendo aproximadamente 43% de celulose, 28% de hemicelulose e 14% de lignina, foi submetido a tratamento hidrotérmico ( $220^{\circ}\text{C}/5\text{min}$ ) seguido de hidrólise pelas enzimas Celulase, Celobiase e Xilanase. O hidrolisado obtido pela degradação das frações celulósica e hemicelulósica continha basicamente glicose e xilose, e foi utilizado como fonte de carbono no meio de cultivo. Na fermentação foi obtido rendimento de 0,96 e produtividade volumétrica igual a  $4,11 \text{ g L}^{-1}$ .

Hidrolisado obtido do bagaço explodido a vapor também foi testado. Constituído basicamente pela fração hemicelulósica, o hidrolisado continha essencialmente xilose. Nesta fermentação alcançou-se rendimento de 0,90 e produtividade volumétrica igual a  $0,225 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Posteriores estudos mostraram que a adaptação da cepa a meios de cultivo contendo apenas pentoses (xilose e arabinose) reduzem a fase lag tendo como consequência o aumento da produtividade.

Estudos de inibição em meio sintético permitiram avaliar o efeito que cada composto causou individualmente na multiplicação celular e na produção do ácido lático. O ácido acético foi o componente que mostrou maior efeito inibitório. Dentro da faixa estudada, furfural e HMF provocaram comportamentos semelhantes, tornando-se inibitórios em concentrações acima de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  na produção de biomassa, mas não na produção de ácido lático. Inibição por xilose também foi investigada. Rendimento máximo igual a 0,95 foi obtido quando  $140 \text{ g L}^{-1}$  de açúcar inicial foram utilizados. Concentrações acima de  $150 \text{ g L}^{-1}$  mostram-se inibitórias ao crescimento microbiano.

Foi possível observar que o bagaço da cana de açúcar é um substrato promissor para produção biotecnológica de ácido lático, um produto químico com alto valor agregado e com versatilidade em aplicações. O microrganismo selecionado, a bactéria *Bacillus coagulans* 162, mostrou-se uma cepa robusta, com relativa tolerância a inibidores e capaz de converter homofermentativamente as pentoses presentes no meio de cultura, característica desejável do ponto de vista produtivo e econômico.

## ABSTRACT

**RODRIGUES, G.A.** Production of lactic acid from sugar cane bagasse. Campinas: UNICAMP, July of 2012, 177 pages. PhD Thesis in Chemical Engineering – Chemical Engineering Department of the University of Campinas.

Production of chemical compounds from lignocellulose residues has attracted attention of actual world society. The search for productive alternatives fossil fuels non-dependent, the use of renewable resources and sustainability are the main reasons. In this work, lactic acid production by fermentation of sugars obtained from sugarcane bagasse, essentially glucose and xylose, was studied.

From several strains of lactic acid bacteria and using a qualitative methodology, 26 microorganisms were selected for shaking flasks and bioreactor tests. The best results were obtained in fermentations using *B. coagulans* 162, reaching yield of 0,95 and volumetric productivity of 2,13 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in simple batch and medium containing glucose, xylose and arabinose. In continuous feeding, the cultivation medium reached 105 g of lactic acid per liter.

The treatment effects of hydrothermal hydrolysis and steam explosion of sugarcane bagasse were also studied. It was verified acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF) formation and glucose, xylose and arabinose release. Bagasse fibers were photographed using Scanning Electron Microscopy (SEM), before and after thermal treatment for visualization of modification in the arrangement of the original structure.

Bagasse *in natura*, containing approximately 43% of cellulose, 28% of hemicellulose and 14% of lignina, was submitted to hydrothermal treatment (220°C/5min) followed by hydrolysis with the enzymes Cellulase, Cellobiase and Xylanase. The obtained hydrolysate of cellulose and hemicellulose fractions contained mainly glucose and xylose, and was used as Carbon source in the cultivation medium. In the fermentation was obtained yield of 0,96 and volumetric productivity equal to 4,11 g L<sup>-1</sup>.

The hydrolysate obtained from steam exploded bagasse was tested. Constituted basically by hemicellulose fraction, the hydrolysate contained mainly xylose. It was reached yield of 0,90 and volumetric productivity equal to 0,225 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Later studies have showed that strains

adaptation in cultivation medium containing only pentose (xylose and arabinose) reduces the lag phase resulting in increase of productivity.

Inhibition studies on synthetic medium allowed to evaluate the effect that each compound caused individually on cell replication and on lactic acid production. Acetic acid was the compound that showed the higher inhibitory effect. In the studied range, furfural and HMF showed similar behaviour becoming inhibitory in concentrations above  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  on biomass production. The same effect was not observed on lactic acid production. Inhibition by xylose was also investigated. Maximum yield, equal to 0,95, was obtained when  $140 \text{ g L}^{-1}$  of initial sugar were used. Concentrations above  $150 \text{ g L}^{-1}$  showed to be inhibitory to the microbial growth.

Sugarcane bagasse showed to be a promissor substrate to biotechnologic production of lactic acid, a chemical with high added value and versatile applications. The selected microorganism, the bacteria *Bacillus coagulans* 162, showed to be a robust strain, with relative tolerance against inhibitors and able to convert homofermentatively the pentose present in hemicellulose hydrolysate, desirable feature in productive and economic terms.

# SUMÁRIO

ABSTRACT .....	xv
SUMÁRIO .....	xvii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xxi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xxiii
NOMENCLATURA .....	xxvii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	29
1.1. Introdução .....	29
1.2. Objetivos .....	31
<b>1.2.1. Objetivo geral</b> .....	31
<b>1.2.2. Objetivos específicos</b> .....	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1. O mercado da cana de açúcar no Brasil e no mundo .....	33
2.2. Bagaço da cana de açúcar – caracterização.....	35
2.3. Hidrólise do material lignocelulósico .....	39
2.4. Biopolímeros e biorrefinarias.....	43
2.5. Ácido lático e Polilactato .....	46
2.6. Biodegradabilidade do Polilactato .....	49
2.7. Linhagens produtoras de ácido lático e rotas metabólicas .....	51
<b>2.7.1. Bactérias lácticas e a espécie <i>Bacillus coagulans</i></b> .....	51
<b>2.7.2. Fermentação de hexose em bactérias lácticas</b> .....	53
<b>2.7.3. Fermentação de pentose em bactérias lácticas</b> .....	54
<b>2.7.4. Fermentação de hexose e pentoses em <i>Bacillus coagulans</i></b> .....	55
3. SELEÇÃO DO MICRORGANISMO.....	59
3.1. Resumo.....	59
3.2. Materiais e métodos .....	61
<b>3.2.1. Microrganismos e manutenção</b> .....	61
<b>3.2.2. Teste em sistema API</b> .....	62
<b>3.2.3. Fermentação em frascos agitados</b> .....	62
<b>3.2.4. Fermentação em Biorreator</b> .....	64
3.3. Resultados e discussão .....	66
<b>3.3.1. API</b> .....	66

<b>3.3.2. Fermentação em frascos agitados</b> .....	68
<b>3.3.3. Fermentação em biorreatores</b> .....	70
3.4. Conclusão .....	80
4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>Bacillus coagulans</i> 162 EM MEIO SINTÉTICO E REGIME DE BATELADA ALIMENTADA .....	81
4.1. Resumo .....	81
4.2. Materiais e métodos .....	82
<b>4.2.1. Microrganismo</b> .....	82
<b>4.2.2. Meio de cultivo</b> .....	82
<b>4.2.3. Inóculo</b> .....	82
<b>4.2.4. Fermentação</b> .....	82
<b>4.2.5. Procedimentos analíticos</b> .....	83
4.3. Resultados e discussão .....	84
4.4. Conclusão .....	92
5. HIDRÓLISE TÉRMICA DO BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR, CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL TRATADO E FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO .....	93
5.1. Resumo .....	93
5.2. Materiais e métodos .....	94
<b>5.2.1. Obtenção do bagaço <i>in natura</i></b> .....	94
<b>5.2.2. Hidrólise térmica</b> .....	94
<b>5.2.3. Hidrólise enzimática</b> .....	95
<b>5.2.4. Determinação analítica das frações de celulose, hemicelulose e lignina</b> .....	96
<b>5.2.5. Fermentação do hidrolisado</b> .....	99
5.3. Resultados e discussão .....	101
<b>5.3.1. Hidrólise térmica</b> .....	101
<b>5.3.2. Fermentação</b> .....	108
5.4. Conclusão .....	111
6. CINÉTICA FERMENTATIVA DE <i>Bacillus coagulans</i> 162 EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO HIDROLISADO DO BAGAÇO EXPLODIDO A VAPOR .....	113
6.1. Resumo .....	113
6.2. Materiais e métodos .....	114
<b>6.2.1. Obtenção dos hidrolisados</b> .....	114
<b>6.2.2. Caracterização do bagaço explodido a vapor</b> .....	114
<b>6.2.3. Fermentação</b> .....	117

6.3. Resultados e discussão .....	119
<b>6.3.1. Caracterização do bagaço</b> .....	119
<b>6.3.2. Obtenção dos hidrolisados</b> .....	120
<b>6.3.3. Fermentação</b> .....	122
6.4. Conclusão.....	128
7. ESTUDO DE INIBIÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E NO CRESCIMENTO DE <i>Bacillus coagulans</i> 162 POR XILOSE, ÁCIDO ACÉTICO, FURFURAL E HMF.....	129
7.1. Resumo.....	129
7.2. Introdução .....	131
7.3. Materiais e métodos .....	137
<b>7.3.1. Microrganismo</b> .....	137
<b>7.3.2. Meio de cultivo</b> .....	137
<b>7.3.3. Inóculo</b> .....	137
<b>7.3.4. Experimentos</b> .....	138
<b>7.3.5. Fermentação</b> .....	140
<b>7.3.6. Métodos analíticos</b> .....	140
7.4. Resultados e discussão .....	142
<b>7.4.1. Inibição por xilose</b> .....	142
<b>7.4.2. Inibição por ácido acético, furfural e HMF</b> .....	144
7.5. Conclusão.....	150
8. FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA EXPLODIDO A VAPOR E DE MEIO SIMULADO POR <i>Bacillus coagulans</i> 162 .....	151
8.1. Resumo.....	151
8.2. Materiais e métodos .....	152
<b>8.2.1. Microrganismo</b> .....	152
<b>8.2.2. Preparo do hidrolisado hemicelulósico detoxificado</b> .....	152
<b>8.2.3. Meios de cultivo</b> .....	152
<b>8.2.4. Inóculo</b> .....	153
<b>8.2.5. Fermentação</b> .....	153
<b>8.2.6. Métodos analíticos</b> .....	154
8.3. Resultados e discussão .....	155
<b>8.3.1. Preparo do hidrolisado em cinco etapas de extração</b> .....	155
<b>8.3.2. Detoxificação do hidrolisado</b> .....	155
<b>8.3.3. Fermentação</b> .....	157

8.4. Conclusão.....	163
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	165
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição do bagaço da cana-de-açúcar em base seca (%) (CTC, 2011).....	36
Tabela 2. Principais rotas metabólicas utilizadas por bactérias lácticas e pela espécie <i>Bacillus coagulans</i> envolvidas na conversão em ácido láctico. ....	56
Tabela 3. Microrganismos testados utilizando API system e suas respectivas temperaturas ótimas de crescimento.....	61
Tabela 4. Relações matemáticas que definem os parâmetros cinéticos obtidos nos estudos de fermentação .....	65
Tabela 5. Consumo de diferentes açúcares por algumas linhagens de bactérias produtoras de ácido láctico obtido pelo teste API System. Os símbolos (+), (-) e (?) significam resultados positivo, negativo e duvidoso, respectivamente, em relação à mudança da cor do meio.....	67
Tabela 6. Fermentação de diferentes linhagens de bactérias para produção de ácido láctico em frascos agitados e meio contendo inicialmente glicose (6,7 g L <sup>-1</sup> ), xilose (6,7 g L <sup>-1</sup> ) e arabinose (6,7 g L <sup>-1</sup> ). ....	69
Tabela 7. Fermentação de diferentes linhagens de organismos produtores de ácido láctico em biorreator de 2 L e meio de cultivo sintético contendo glicose (6,7 g L <sup>-1</sup> ), xilose (6,7 g L <sup>-1</sup> ) e arabinose (6,7 g L <sup>-1</sup> ). ....	77
Tabela 8. Dados obtidos durante crescimento das linhagens selecionadas em biorreator. ....	78
Tabela 9. Parâmetros cinéticos da fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio sintético e batelada alimentada: 1ª etapa (batelada simples) e 2ª etapa (alimentação contínua). ....	85
Tabela 10. Resumo dos parâmetros medidos durante hidrólise hidrotérmica do bagaço de cana de açúcar .....	101
Tabela 11. Componentes remanescentes em 20 g de bagaço da cana de açúcar <i>in natura</i> (base seca) após tratamento hidrotérmico.....	103
Tabela 12. Concentração de açúcares e ácido acético encontrados na fração líquida dos hidrolisados hidrotérmicos obtidos sob diferentes condições de tempo e temperatura. O teor de bagaço (em base seca) foi equivalente a 8%.....	104
Tabela 13. Concentrações de açúcares e ácido acético encontrados no hidrolisado obtido a partir de 100 g de bagaço da cana de açúcar diluído em 1150 mL de água após hidrólise térmica (220°C/5 min/24.2 bar/ 345 rpm) seguida de hidrólise enzimática por Celulase 15 FPU, Celobiase 60 CBU e Xilanase 300 XU por grama de matéria seca. ....	108
Tabela 14. Parâmetros cinéticos no crescimento de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo contendo hidrolisado.....	108
Tabela 15. Frações obtidas do bagaço antes e após tratamento de explosão a vapor.....	119
Tabela 16. Concentrações encontradas nos diferentes hidrolisados obtidos a partir do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor (100 g de bagaço seco/900 g de água destilada). ....	120

Tabela 17. Concentrações encontradas nos diferentes meios de cultivo obtidos a partir dos hidrolisados do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor.....	122
Tabela 18. Dados cinéticos obtidos na fermentação de hidrolisados por <i>B. coagulans</i> 162....	126
Tabela 19. Concentração de xilose no meio de cultivo MRS modificado para fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 (150rpm/52°C/48h). ....	138
Tabela 20. Concentração dos compostos furfural, HMF e ácido acético no meio de cultivo MRS modificado contendo 20 g L <sup>-1</sup> de glicose para fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 (150rpm/52°C/48h).....	139
Tabela 21. Níveis experimentais utilizados nos testes de inibição causado por furfural, HMF e ácido acético no cultivo de <i>B. coagulans</i> 162. ....	148
Tabela 22. Meios de cultivo utilizados no teste de fermentação contendo hidrolisado hemicelulósico do bagaço explodido a vapor preparado de acordo com Venus (2006).....	153
Tabela 23. Obtenção de sólidos solúveis extraídos do bagaço da cana de açúcar com água destilada. Concentração de bagaço igual a 10% (em base seca).....	155
Tabela 24. Quantidades médias de inibidores encontradas no hidrolisado do bagaço explodido a vapor antes e após detoxificação com carvão ativado (5% em relação à massa seca de bagaço) .....	155
Tabela 25. Quantidades médias de monossacarídeos livres (xilose e glicose) encontradas no hidrolisado do bagaço explodido a vapor antes e após uso de carvão ativado (5% em relação à massa seca de bagaço).....	156
Tabela 26. Parâmetros cinéticos obtidos na fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio MRS <sub>1</sub> (controle). ....	159
Tabela 27. Parâmetros cinéticos obtidos na fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio MRS <sub>2</sub> ( meio de cultivo sintético contendo inibidores). ....	159
Tabela 28. Parâmetros cinéticos obtidos na fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de MRS <sub>3</sub> (meio de cultivo contendo HHD). ....	160

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos principais componentes do material lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) e suas respectivas localizações. ....	35
Figura 2. Estrutura da celulose: unidades de $\beta$ -D-glicose unidas por ligações $\beta$ -1,4 e orientadas com os grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ alternados acima e abaixo do plano da molécula produzindo uma cadeia longa e não ramificada. A ausência de cadeias laterais permite às moléculas de celulose se alinharem próximas umas às outras formando uma estrutura rígida. A celulose é o maior componente estrutural das plantas. ....	36
Figura 3. Estrutura mais comum da hemicelulose: unidades de xilose unidas por ligações $\beta$ -1,4 formando esqueleto de xilana com unidades de L-arabinofuranose (L-arabinose na conformação de anel de 5 átomos) ligadas à cadeia principal por ligações $\alpha$ -1,2 e/ou $\alpha$ -1,3. ....	37
Figura 4. Exemplo da estrutura da lignina. As ligninas são sintetizadas pelo acoplamento oxidativo de monômeros de álcool <i>p</i> -hidroxicinamílico (VANHOLME <i>et al.</i> , 2008). ....	38
Figura 5. Preço de mercado <i>versus</i> volume dos produtos “bio-based”. Adaptado de DE JONG <i>et al.</i> (2009). ....	45
Figura 6. Isômeros L-ácido lático (à esquerda) e D-ácido lático (à direita).....	46
Figura 7. Imagem da cepa <i>Bacillus coagulans</i> 162 obtida por microscopia ótica, aumento de 500x.....	52
Figura 8. Principais rotas fermentativas da glicose em bactérias lácticas (Fonte: KANDLER, 1983). ....	54
Figura 9. Dissimilação de pentoses em bactérias lácticas. Adaptado de KANDLER (1983). ....	55
Figura 10. Vias metabólicas presentes em bactérias lácticas. Via das Pentoses Fosfato está presente em <i>Bacillus coagulans</i> possui: mecanismo de conversão de pentoses em ácido lático homofermentativamente. ....	57
Figura 11. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem ATB34 em meio $\text{MRS}_{\text{GAX}}$ contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono.....	71
Figura 12. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> em meio $\text{MRS}_{\text{GAX}}$ contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. ....	72
Figura 13. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem <i>L. rhamnosus</i> em meio $\text{MRS}_{\text{GAX}}$ contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. ..	72
Figura 14. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem <i>L. paracasei</i> em meio $\text{MRS}_{\text{GAX}}$ contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. ..	73
Figura 15. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem <i>L. lactis</i> em meio $\text{MRS}_{\text{GAX}}$ contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. ..	74
Figura 16. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem ATB49 em meio $\text{MRS}_{\text{GAX}}$ contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono.....	75

Figura 17. Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem <i>B. coagulans</i> 162 em meio MRS <sub>GAX</sub> contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono.....	75
Figura 18. Consumo de NaOH 20% durante crescimento das linhagens selecionadas em biorreator 2 L. ....	78
Figura 19. Curva de crescimento de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo sintético em biorreator Newbrunswick (USA), com capacidade de 3,5 L.....	84
Figura 20. Consumo de NaOH 20% durante fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo sintético em regime de batelada seguido de alimentação contínua. As fases 1a e 1b correspondem à 1ª etapa (ou batelada). A fase 2 corresponde à 2ª etapa (alimentação contínua).....	85
Figura 21. Desafios técnicos para desenvolvimento de biocatalisadores para produção de compostos químicos de alto valor agregado e combustíveis a partir de hidrolisados lignocelulósicos. Microrganismos do grupo A incluem <i>E. coli</i> e alguns <i>Bacillus</i> . Devido à repressão catabólica (CCR), a utilização das pentoses se inicia apenas quando as hexoses se esgotam do meio. Microrganismos do grupo B possuem deficiência no uptake de pentoses e/ou na produção de enzimas. Fonte: JOJIMA <i>et al.</i> (2010).....	87
Figura 22. Reprodução em maior escala da 1ª etapa (regime de batelada) durante cinética de produção de ácido láctico e consumo de açúcares por <i>B. coagulans</i> 162. ....	88
Figura 23. Produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) e rendimento ( $Y_{p/s}$ ) durante fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 (150 rpm/52°C/pH 6) para produção de ácido láctico em biorreator e meio sintético contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono em regime de alimentação semi contínua. ....	89
Figura 24. Equipamento utilizado para hidrólise hidrotérmica. A. Sistema controlador da temperatura; B. hélice; C. Reator; D. Motor do eixo axial; E. Sistema de armazenamento de dados. ....	95
Figura 25. Frações sólidas residuais após tratamento hidrotérmico. Material utilizado para análise de celulose, hemicelulose, lignina insolúvel e cinzas.....	102
Figura 26. Filtrados após tratamento térmico em diferentes temperaturas (220, 200 e 180°C) e tempos (5, 10 e 15 min). Material utilizado para análise de açúcares (glicose e xilose), lignina solúvel e ácido acético. ....	102
Figura 27. Valores de ácido acético obtidos de 100 g de bagaço da cana de açúcar (base seca) durante tratamentos térmicos.....	105
Figura 28. Bagaço de cana de açúcar <i>in natura</i> . Fotografia eletrônica de varredura. Direita: vista longitudinal. Esquerda: vista transversal. Ambas em aumento de 2.000x.....	106
Figura 29. Bagaço hidrotermicamente tratado a 220°C/5min. Fotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura. (a) Aumento de 450x (b) Aumento de 2.000x.....	107
Figura 30. Bagaço hidrotermicamente tratado a 220°C/15min. Fotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura. (a) Aumento de 450x (b) Aumento de 2.000x.....	107

Figura 31. Fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo contendo hidrolisado do bagaço da cana de açúcar obtido através de hidrólise hidrotérmica seguida de hidrólise enzimática. ....	109
Figura 32. Fotografia eletrônica de varredura do bagaço <i>in natura</i> . Aumento de 2.000x. ....	121
Figura 33. Fotografia eletrônica de varredura do bagaço explodido a vapor. Aumento de 5 000x.....	121
Figura 34. Fermentação do meio de cultivo MRS <sub>SE1</sub> contendo água de lavagem do bagaço de cana de açúcar explodido a vapor .....	123
Figura 35. Fermentação do meio de cultivo MRS <sub>SE2</sub> contendo água de lavagem do bagaço de cana de açúcar explodido a vapor concentrado por rota- evaporação e detoxificado.....	123
Figura 36. Fermentação do meio de cultivo MRS <sub>SE3</sub> contendo bagaço de cana de açúcar explodido a vapor seguido por hidrólise enzimática.....	124
Figura 37. Curva de crescimento de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo contendo diferentes hidrolisados do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor.....	125
Figura 38. Principais vias de degradação de materiais lignocelulósicos, exemplificado a partir de madeira de Abeto. Adaptado de PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL (2000).....	132
Figura 39. Biomassa final obtida durante fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de xilose durante estudo de inibição por substrato. ....	142
Figura 40. Rendimento de ácido láctico obtido durante fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de xilose durante estudo de inibição por substrato. ....	143
Figura 41. Velocidades específicas de crescimento obtidas durante fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de xilose durante estudo de inibição por substrato.....	143
Figura 42. Biomassa obtida em fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meios de cultivo contendo furfural ou HMF após 48h a 150rpm e 52°C. ....	144
Figura 43. Biomassa e ácido láctico obtidos em fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meios de cultivo contendo furfural ou HMF após 48h a 150rpm e 52°C.....	146
Figura 44. Biomassa obtida em fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo contendo ácido acético após 48h a 150rpm e 52°C. Análise estatística com 95% de confiança. ....	147
Figura 45. Biomassa e ácido láctico obtidos na fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo contendo ácido acético após 48h a 150rpm e 52°C. ....	148
Figura 46. Rendimento obtido nos experimentos de inibição por furfural, HMF e ácido acético na fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em meio de cultivo contendo 20 g L <sup>-1</sup> de glicose após 48h a 150rpm e 52°C.....	149
Figura 47. Fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em regime de batelada alimentada utilizando-se: 1) Meio de cultivo 1 ou Controle (meio MRS modificado contendo xilose e glicose sem inibidores); 2) Meio 2 (meio sintético, MRS modificado, contendo	

açúcares e inibidores e 3) Meio 3 (meio MRS modificado contendo Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado). .....	158
Figura 48. Fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em regime de batelada alimentada utilizando-se meio MRS <sub>1</sub> (Controle). .....	158
Figura 49. Fermentação de <i>B. coagulans</i> 162 em regime de batelada alimentada utilizando-se meio de cultivo 2, MRS modificado, contendo inibidores furfural, HMF e ácido acético. ....	159

## NOMENCLATURA

$Y_{P/S}$ : rendimento (obtenção de produto/substrato)

$Q_p$ : produtividade volumétrica ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

Ef. (%): rendimento x 100% (%)

$\mu_x$ : velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_p$ : velocidade específica de formação de produto ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_s$ : velocidade específica de consumo de substrato ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_{\text{máx}}$ : velocidade máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

EMP: Embden Meyerhof-Parnas Pathway (Via glicolítica). Principal via de consumo de glicose.

HT: Hidrólise térmica em meio contendo água, sob alta pressão e temperatura.

MRS padrão: meio de cultivo para bactérias lácticas proposto por De Man *et al.* (1960) contendo: peptona ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ); extrato de carne ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ); extrato de levedura ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ); dextrose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ); polissorbato 80 ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ); citrato de amônio ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ); acetato de sódio ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ); pH 6.4 (medido a  $25^\circ\text{C}$ )

MRS ágar padrão: meio MRS padrão contendo ágar ( $15 \text{ g L}^{-1}$ )

MRS modificado: meio de cultivo MRS reduzido contendo extrato de levedura ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4$  ( $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ) e glicose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ )

$\text{MRS}_{\text{ARA}}$ : meio de cultivo MRS modificado contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de arabinose como fonte de carbono.

$\text{MRS}_{\text{GAX}}$ : meio de cultivo MRS modificado contendo  $6,7 \text{ g L}^{-1}$  de glicose,  $6,7 \text{ g L}^{-1}$  de xilose e  $6,7 \text{ g L}^{-1}$  de arabinose como fontes de carbono.

$\text{MRS}_{\text{GLI}}$ : meio de cultivo MRS modificado contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose como fonte de carbono.

$\text{MRS}_{\text{HT}}$ : meio de cultivo MRS modificado sem adição de glicose, contendo hidrolisado da cana-de açúcar obtido por hidrólise térmica (HT).

$\text{MRS}_{\text{SE}}$ : meio de cultivo MRS modificado sem adição de glicose, contendo hidrolisado da cana-de açúcar obtido do bagaço explodido a vapor seguido de hidrólise enzimática.

$\text{MRS}_{\text{WW}}$ : meio de cultivo MRS modificado sem adição de açúcar, porém contendo hidrolisado da cana-de açúcar obtido da água de lavagem do bagaço explodido a vapor.

MRS<sub>XIL</sub>: meio de cultivo MRS modificado contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose como fonte de carbono.

PKP: Phosphoketolase Pathway (Via fosfoquetolase)

PPP: Pentose Phosphate Pathway (Via das pentose fosfato)

SE: Steam Explosion. Tratamento térmico de explosão a vapor, normalmente utilizado como pré-tratamento para auxiliar na hidrólise enzimática.

WW: Washing Water. Água de lavagem do bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor.

### 1.1. Introdução

O ácido láctico é um composto químico que pode ser obtido via síntese química ou fermentativa e possui aplicações nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e de polímeros. Dentre estas aplicações, a produção de polilactato (PLA) se destaca por ser, este polímero, uma opção a ser considerada na substituição de plásticos derivados de petróleo. O PLA é um polímero versátil e possui várias características desejáveis: transparência, brilho, resistência mecânica, resistência térmica e biodegradabilidade.

O interesse em se produzir ácido láctico a partir de bagaço da cana-de-açúcar é parte de um esforço global em empregar recursos naturais renováveis na produção de compostos químicos, via conversão de açúcares hemicelulósicos, em detrimento do consumo das fontes fósseis de energia.

Para o Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar, obtido durante produção de álcool e açúcar, é de importância ímpar. O emprego deste sub-produto, até então considerado resíduo e empregado exclusivamente na cogeração de energia elétrica, representa uma opção econômica estratégica. Uma das melhores alternativas para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos ainda é lançar mão de recursos biotecnológicos. A partir da seleção criteriosa da cepa microbiana, do meio de cultivo e do processamento a serem empregados pode-se obter alto rendimento na produção de compostos químicos. Muito esforço tem sido empregado com o objetivo de se solucionar algumas limitações que o processo ainda enfrenta. Dentre estes problemas podemos citar a dificuldade em se encontrar microrganismos na natureza capazes de utilizar pentoses com alta eficiência em suas vias metabólicas e promover hidrólise eficiente do material sem significativa formação de compostos inibidores e degradação dos açúcares. A produção biotecnológica de compostos químicos com alto valor agregado a partir de fontes renováveis residuais, que não competem diretamente com a produção de alimentos, pode apenas trazer vantagens.

Nunca se observou tamanha urgência em se encontrar soluções sustentáveis para a substituição dos derivados petroquímicos como se vê atualmente. As fontes naturais de petróleo estão estimadas para se esgotarem em meados da década de 2050, O Brasil possui posicionamento privilegiado enquanto país potencial produtor de energia sustentável.



## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo geral**

Estudar o potencial de produção de ácido láctico por via fermentativa a partir da utilização de hidrolisados do bagaço de cana-de-açúcar como fonte primária de carboidratos e da seleção de microrganismo adequado para o processo. Tal estudo permite auxiliar as indústrias sucroalcoleiras em aumentar seu portfólio tornando-se mais competitivas no mercado global.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

Selecionar uma cepa capaz de utilizar xilose, glicose e arabinose com alta eficiência na produção de ácido láctico.

Selecionar uma cepa robusta, tolerante a inibidores, basicamente ácido acético, furfural e HMF naturalmente presentes no hidrolisado hemicelulósico.

Verificar o efeitos dos tratamentos térmicos na degradação das frações do bagaço

Obter os parâmetros cinéticos de crescimento do microrganismo selecionado em meio sintético e meios de cultivo contendo hidrolisados obtidos por diferentes tratamentos (hidrotérmico, enzimático e explosão a vapor).

Estudar a inibição por xilose na produção de ácido láctico e do crescimento celular de *Bacillus coagulans* 162.

Estudar a inibição por ácido acético, furfural e HMF na produção de ácido láctico e no crescimento celular de *Bacillus coagulans* 162.

Alcançar a concentração de produto (ácido láctico) máxima em fermentação contínua



### 2.1. O mercado da cana de açúcar no Brasil e no mundo

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de cana de açúcar do mundo. Responsável por mais da metade de todo o açúcar comercializado globalmente, este país deverá alcançar uma taxa de crescimento médio de produção igual a 3,25% até 2018/19 (MAPA, 2011).

O crescente interesse pela produção de cana de açúcar se deve essencialmente ao aumento na demanda pelo etanol combustível, o qual, aliado à sacarose, desenvolve o papel de importante produto obtido desta planta. O álcool, empregado na indústria química, fabricação de bebidas e como carburante, é hoje a principal fonte de bioenergia utilizada no mundo. Entre 2000 e 2004, sua produção mundial cresceu 46,8%, quando atingiu 41 bilhões de litros, dos quais quase 73% foram usados como combustível. Os maiores produtores de álcool são também os maiores consumidores – juntos, Brasil e Estados Unidos, foram responsáveis por quase 70% da produção e do consumo mundial de 2004, seguidos pela China (8,9%), União Européia (5,3%) e Índia (4%), que utilizam o biocombustível misturado à gasolina em diferentes percentuais (LICHT, 2005). O Brasil, líder na produção e consumo de álcool, obteve na safra de 2006/07 uma produção recorde de 17.7 bilhões de litros, dos quais 80% foram destinados ao mercado interno e 20% ao externo. O crescimento atual assenta-se, mormente, nas vendas de veículos flexíveis (bicombustíveis) (PAULILLO *et al.*, 2007). A produção de etanol projetado para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro do registrado em 2008 (MAPA, 2011).

De acordo com a FAO (2011) foram colhidas 1,74 bilhões de toneladas de cana de açúcar no mundo em 2008, montante no qual o Brasil foi responsável por 37,2%, seguido pela Índia (20%), China (7,2%), Tailândia (4,2%), Paquistão (3,7%), México (2,9%), Colômbia (2,2%) e Austrália (1,9%). Segundo as estatísticas da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA 2011), na safra 2008/09 o Brasil processou cerca de 570 milhões de toneladas de cana, produzindo ao redor de 160 milhões de toneladas de bagaço. Toda cana-de-açúcar produzida no Brasil ainda apresenta potencial de mais de 160 milhões de toneladas de palha e, provavelmente, somente 6% desse material acompanhou os colmos de cana até a indústria sendo que o restante foi queimado ou permaneceu no campo.

A safra mundial de 2010/11 foi de aproximadamente 2 bilhões de toneladas de cana de açúcar e o Brasil contribuiu com 30% deste montante ou 624.991 mil toneladas de acordo com o terceiro levantamento da safra divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) em Janeiro de

2011, Do total da cana esmagada, 46,2% serão destinados à produção de açúcar e 53,8% serão destinados à produção de etanol, gerando um volume total de 27,7 bilhões de litros (CONAB, 2011).

A economia mundial se vê frente à necessidade de se produzir etanol a um preço competitivo. De acordo com PAULILLO *et al.* (2007), no panorama atual da agroindústria canavieira, já no século XXI e em um contexto de desregulamentação setorial, importa estar atento à apuração dos custos, ao desenvolvimento de novas tecnologias e aproveitamento de subprodutos, visando diferenciação e adotando o paradigma tecnológico como forma de definir o que é relevante para uma situação mais competitiva.

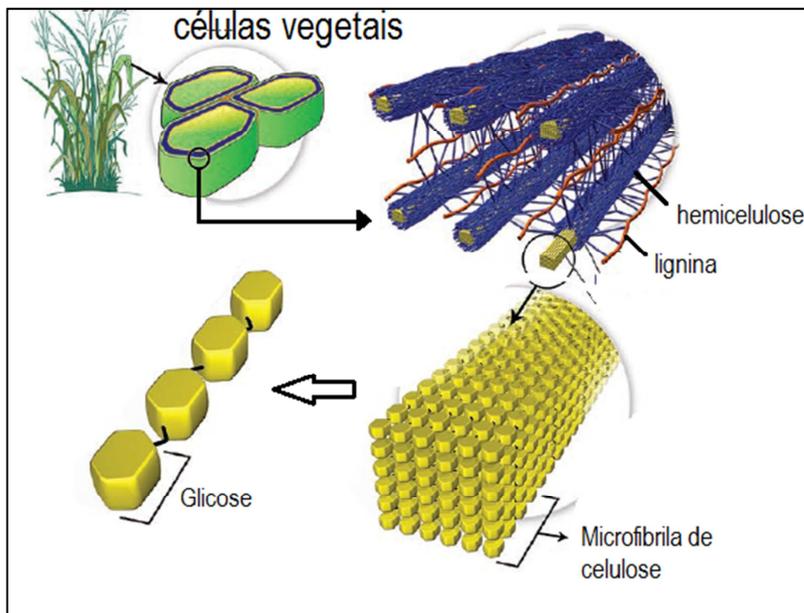
Na indústria sucroalcooleira, o caldo de cana pode ter sua utilização direcionada para produção de etanol em detrimento da produção de sacarose, ou vice versa, conforme interesse dos produtores que intencionam alcançar os melhores preços destas commodities praticados pelo mercado. O bagaço, seja na forma *in natura* ou como hidrolisado lignocelulósico, utilizado na produção de energia elétrica, de etanol de segunda geração e de químicos via síntese biotecnológica poderia ser encarado da mesma forma.

O enorme esforço em pesquisa para encontrar as melhores alternativas para utilização de fontes renováveis de energia se justifica em vista da urgência de se produzir combustíveis substitutos daqueles oriundos da indústria petroquímica. Neste contexto, encontrar outras possibilidades para utilização do bagaço além desta atualmente praticada – exclusivamente produção de energia elétrica – justifica o seu emprego como alternativa na produção de combustíveis e compostos químicos de alto valor agregado que podem ser obtidos biotecnologicamente. Além disso, com o aumento do portfólio das indústrias sucroalcooleiras, estas se tornam mais competitivas no mercado globalizado pelo aumento da carta de produtos que podem oferecer.

## 2.2. Bagaço da cana de açúcar – caracterização

O bagaço é uma biomassa e apresenta-se como um resíduo fibroso resultante da moagem de cana, possuindo entre 48-52% de umidade, 2-3% de sólidos solúveis (Brix) e 46-48% de sólidos insolúveis (fibra). Cada tonelada de cana processada gera aproximadamente 280 kg de bagaço. Esse valor é obtido pelo princípio da tecnologia sucroalcooleira de que toda fibra que entra com a cana na moenda ou difusor é igual à quantidade de fibra que sai com o bagaço. Em sua composição elementar, o bagaço possui em média 46,4% de Carbono, 6,1% de Hidrogênio, 44,0% de Oxigênio, 0,2% de Nitrogênio e 2,5% de cinzas (CTC, 2011).

A biomassa, constituída por celulose, hemicelulose e lignina, é um meio de armazenar energia solar e por isso representa uma fonte importante de matéria-prima e energia. Em geral, a parede celular vegetal é constituída por quantidades que variam entre 40-80% de celulose, 10-40% de hemicelulose e 5-25% de lignina. Os principais componentes da biomassa e sua localização estão representados na **Figura 1**.



**Figura 1.** Estrutura dos principais componentes do material lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) e suas respectivas localizações. Adaptado de Wyman & Yang (2009).

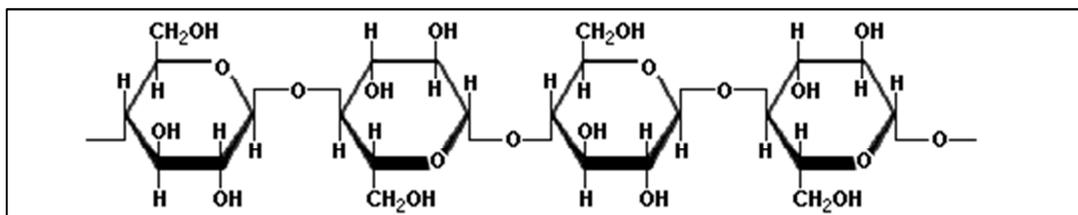
As microfibrilas de celuloses se apresentam incorporadas à lignina em um arranjo que confere resistência ao conjunto (CHANDEL *et al.*, 2010). A **Tabela 1** apresenta alguns resultados da composição em celulose, hemicelulose, lignina e cinzas encontrados por diferentes autores. Esta composição pode variar de acordo com a variedade, idade e manejo das plantas.

**Tabela 1.** Composição do bagaço da cana-de-açúcar em base seca (%) (CTC, 2011).

celulose	hemicelulose	lignina	cinzas	Referência
40,2	26,4	25,2	n.d.	CHANDEL <i>et al.</i> (2010)
37	28	21	n.d.	BOM (2007)
26-47	19-33	14-23	1-5	PATURAU (1989)
38	33	22	3	TRICKETT & NEYTZELL-DE WILDE (1982)*

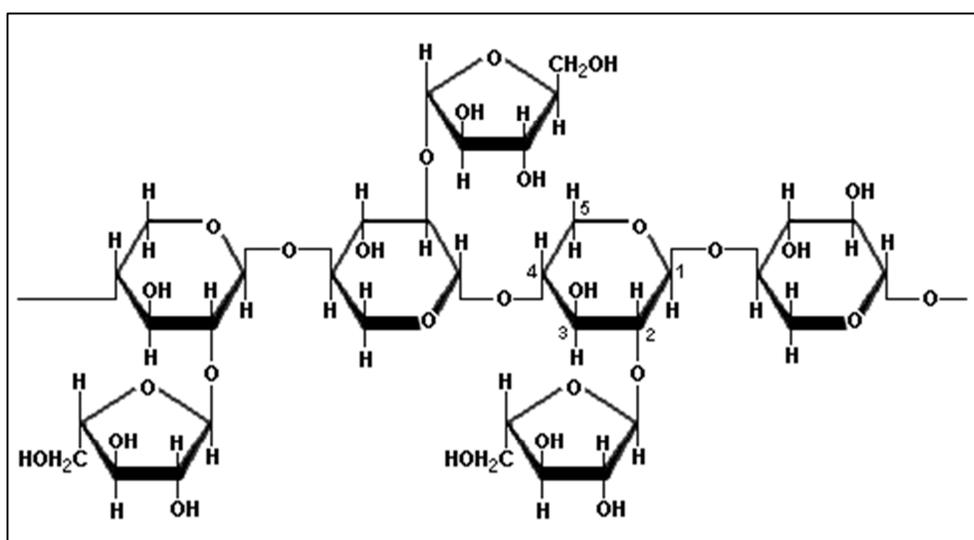
\* trabalho citado em WALFORD (2008)

A celulose (**Figura 2**) é um homopolímero linear formada por unidades de glicose anidra, unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Cujas estrutura original apresenta mais de  $10^4$  resíduos de  $\beta$ -glicose anidra, massa molar de aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  e comprimento de 5  $\mu\text{m}$ . A celulose apresenta região desordenada ou amorfa (10-50%) e uma região ordenada ou cristalina (50-90%). As cadeias de celulose agregam-se para formar as fibrilas elementares. A biodegradabilidade da molécula de celulose está relacionada à distribuição e configuração destas duas frações, bem como sua associação com outros compostos como lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais (CHANDEL *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Estrutura da celulose: unidades de  $\beta$ -D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 e orientadas com os grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$  alternados acima e abaixo do plano da molécula produzindo uma cadeia longa e não ramificada. A ausência de cadeias laterais permite às moléculas de celulose se alinharem próximas umas às outras formando uma estrutura rígida. A celulose é o maior componente estrutural das plantas.

As hemiceluloses (**Figura 3**) são heteropolímeros constituídos por galactose, xilose, arabinose e ácidos urônicos. Possuem um esqueleto de unidades de xilose conectado a glicose, galactose, manose e açúcares ácidos. Possuem estrutura amorfa com cadeias de pequeno comprimento formadas por 2 a 6 resíduos de açúcares diferentes unidos por ligações  $\beta$ -1,4. Apresentam grau de polimerização de aproximadamente 200 unidades. A forma mais abundante apresenta D-xilose na cadeia principal e L-arabinose nas cadeias laterais. Depois da celulose, é o polímero mais abundante e representa aproximadamente 20-35% da biomassa lignocelulósica (CHANDEL *et al.*, 2010).

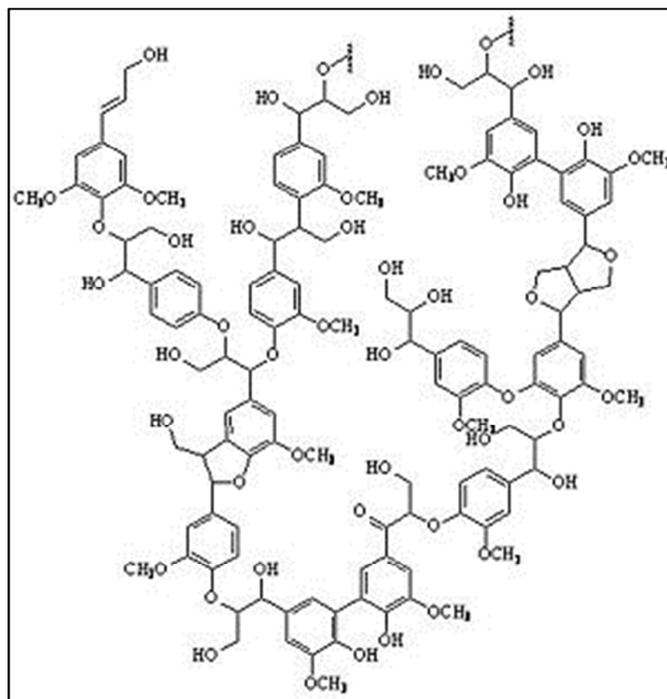


**Figura 3.** Estrutura mais comum da hemicelulose: unidades de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 formando esqueleto de xilana com unidades de L-arabinofuranose (L-arabinose na conformação de anel de 5 átomos) ligadas à cadeia principal por ligações  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3.

A lignina (**Figura 4**) é um polímero altamente estável formado por resíduos fenilpropanóicos metoxilados, sintetizado como parte do sistema vascular de plantas e constitui uma das mais abundantes polímeros orgânicos no planeta (ERIKSSON & BERMEK, 2009). Estes monômeros são distribuídos aleatoriamente, formando uma estrutura tridimensional e é o resultado da desidratação de três álcoois monoméricos: trans-p-cumarílico, trans-coniferílico e trans-sinapílico. A proporção entre eles varia podendo ocorrer presença de diferentes ligninas dentro de uma mesma planta.

Os teores de lignina nas angiospermas e gimnospermas variam entre 20-25% e 28-32%, respectivamente. A lignina se apresenta normalmente distribuída com a hemicelulose no espaço

entre as microfibrilas de celulose nas paredes celulares primária e secundária, e na lamela média para adesão celular. A lignina confere a resistência mecânica da qual as plantas necessitam para se erguerem. Ela também tem a função de auxiliar na condução da seiva através dos elementos vasculares e para defender as plantas contra ataques de microrganismos e insetos. A biossíntese do monômero de lignina é realizada por uma complexa via de reações bioquímicas chamada Via Cinamato, utilizando glicose, ácido shikímico, L-fenilalanina e ácido cinâmico. Os polímeros de lignina são formados pela oxidação de monômeros fenólicos em seus radicais fenoxil correspondentes pelas enzimas peroxidases e lacases. Estes radicais se polimerizam espontaneamente e sem o auxílio de nenhuma enzima. Apesar do papel das peroxidases e lacases no processo de lignificação permanecer controverso existe um consenso de que as ligninas são sintetizadas pela polimerização de radicais livres dos três diferentes fenilpropanóides (ERIKSSON & BERMEK, 2009).



**Figura 4.** Exemplo da estrutura da lignina. As ligninas são sintetizadas pelo acoplamento oxidativo de monômeros de álcool *p*-hidroxicinâmílico (VANHOLME *et al.*, 2008).

Na cana de açúcar, os teores de glicose, xilose e arabinose no bagaço representam 40%, 22,5% e 2% (em base seca), respectivamente (CHANDEL *et al.*, 2010). Todos os extratos contêm baixas concentrações de açúcar por causa da diluição da celulose amorfa de baixo peso molecular e glucomanas. Algumas indústrias têm interesse de preservar a porção de celulose para produção

de polpa (celulose) que possui valores maiores como fibra que como matéria prima para combustíveis e compostos químicos (VAN HEININGEN, 2006). Portanto, para ser viável economicamente é importante que todos os açúcares derivados da biomassa (glicose, manose, galactose, xilose e arabinose) sejam utilizados pelo microrganismo com alta eficiência (SAHA, 2003). Além disso, a concentração do produto no meio fermentado deve ser alta suficiente para cobrir os custos com os processos de recuperação e purificação (WALTON *et al.*, 2010).

Processos biotecnológicos para conversão de materiais lignocelulósicos têm se tornado mais viáveis do ponto de vista econômico. Enzimas que degradam a celulose, por exemplo, são produzidas em larga escala por vários fornecedores e a preços relativamente baixos. Além disso, outras opções de hidrólise estão disponíveis, restando decidir qual a técnica adequada a ser utilizada (ERIKSSON & BERMEK, 2009).

### **2.3. Hidrólise do material lignocelulósico**

De toda a biomassa disponível no mundo, 75% está na forma de carboidratos (celulose, hemicelulose, amido e sacarose), 20% de lignina e 5% de outros compostos (óleos e proteínas) (KAMM & KAMM, 2004). A susceptibilidade dos resíduos lignocelulósicos ao ataque enzimático depende essencialmente da facilidade de acesso da enzima à celulose e à hemicelulose, o que por sua vez depende basicamente de algumas características estruturais do material como grau de inchamento da fibra; grau de cristalinidade; ordenamento molecular, presença de lignina e estrutura capilar da fibra de celulose. A biodegradabilidade da celulose varia entre as diferentes espécies de plantas, e depende da força de associação entre a celulose e outros compostos. A composição e a proporção entre hemicelulose e lignina são estritamente dependentes da natureza do material. Há mais lignina em gimnospermas que em angiospermas ou em resíduos agrícolas (por exemplo, palha de trigo ou bagaço da cana de açúcar). O maior componente hemicelulósico dos resíduos agrícolas é a xilana (KOVACS *et al.*, 2010). Dependendo do processo é desejável que diferentes frações de material lignocelulósico sejam extraídas e utilizadas separadamente.

Os pré-tratamentos atuam aumentando a susceptibilidade do material lignocelulósico visando melhorar a bioconversão durante a fermentação. Eles promovem modificações na estrutura amorfa, provocam mudança na área superficial da fibra e diminuem a associação protetora da lignina mantendo, contudo, a estrutura capilar da fibra. Existem vários pré-tratamentos para hidrólise do material hemicelulósico: ácido diluído, álcali, explosão da fibra com amônia, peróxido de

hidrogênio, explosão a vapor, oxidação por umidade, água quente, sulfito de sódio (CHANDEL *et al.*, 2010; CHANDEL *et al.*, 2007a). De forma geral, estes pré-tratamentos podem ser resumidos como: biológicos, físicos, químicos ou uma combinação deles.

De acordo com YANG & WYMAN (2008) o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é o ponto crítico que define o custo do etanol celulósico. Do ponto de vista de degradação da matéria prima isto também pode ser aplicado à obtenção de produtos químicos obtidos via fermentação. Estes autores afirmam que pré-tratamentos biológicos oferecem algumas vantagens conceituais importantes como a pequena necessidade de uso de compostos químicos e de energia, porém um sistema eficientemente controlável e suficientemente rápido ainda não foi encontrado. O desempenho de pré-tratamentos físicos, como a fragmentação (moagem, por exemplo) é pobre, enquanto os custos são elevados. Usar somente vapor como pré-tratamento possui a vantagem de ser um sistema muito mais simples, porém os rendimentos são muito baixos para ser economicamente viável em várias aplicações. A extração com água quente tem se mostrado efetiva na recuperação da hemicelulose com altos rendimentos, removendo mais da metade da lignina e produzindo celulose altamente digerível, mas os requerimentos de água e energia excessivos é um desafio que necessita ser superado para que este sistema seja viável comercialmente.

Processos físicos em geral visam reduzir o grau de cristalinidade, o grau de polimerização, o tamanho das partículas e aumentar a fração solúvel em água. Temperaturas na faixa de 150-200°C levam ao aumento da bioconversão dos materiais lignocelulósicos pois podem promover o aumento dos poros da fibra, a auto-hidrólise e o umedecimento do material permitindo maior acesso das enzimas à celulose.

Hidrólise térmica, de acordo com DOGARIS *et al.* (2009), consiste em tratar o material lignocelulósico com água quente, e possui a vantagem de não haver adição de compostos químicos, o que torna este processo benéfico ao meio ambiente.

Explosão a vapor foi definida por JACQUET *et al.* (2010) como um processo termo-mecânico-químico que proporciona a quebra dos componentes estruturais lignocelulósicos por aquecimento a vapor, hidrólise das ligações glicosídicas por ácidos orgânicos formados durante o processo e força de cisalhamento devido à expansão da mistura. O processo é composto de dois estágios: injeção de vapor e descompressão explosiva. Efeitos acumulados de ambas as fases incluem modificação das propriedades físicas do material (área de superfície específica, capacidade de retenção de água, coloração, taxa de cristalinidade da celulose), hidrólise dos

componentes hemicelulósicos (liberação de mono e oligossacarídeos) e modificação da estrutura química da lignina. Estes efeitos permitem a abertura das estruturas lignocelulósicas e aumento da taxa de hidrólise enzimática dos componentes celulósicos com o objetivo de se obter açúcares fermentáveis usados nos processos de produção de combustíveis de segunda geração ou químicos de alto valor agregado. Vários trabalhos que utilizaram explosão a vapor para pré-tratar o material lignocelulósico foram reportados. KAAR *et al.* (1998) relatam a utilização da biomassa lavada com água após a explosão a vapor como forma de remover a fração hemicelulósica.

Processos químicos como o uso de hidróxido de sódio visam o rompimento da estrutura de lignina, diminuição do grau de cristalinidade, hidratação e inchamento da celulose. Quando combinado com processos térmicos possuem eficiência aumentada. A lignocelulose pode ser tratada quimicamente antes da hidrólise enzimática para aumentar a eficiência na sacarificação em açúcares fermentáveis. A redução da cristalinidade da biomassa torna o material mais acessível a reações enzimáticas (CHANDEL *et al.*, 2010).

Pré-tratamento ácido consiste basicamente em hidrólise da fração hemicelulósica. As frações celulose e lignina permanecem praticamente inalteradas. Em geral, ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido clorídrico (HCl), ácido fluorídrico (HF) ou ácido acético ( $H_3CCOOH$ ) são empregados como catalisadores (AGUILAR *et al.*, 2002). A ação consiste em romper as ligações de éter heterocíclicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas da hemicelulose e celulose pelos prótons liberados pelos ácidos. Vários compostos são obtidos principalmente xilose, glicose e arabinose bem como oligômeros, furfural e ácido acético. Como as ligações da cadeia de celulose são mais fortes que as ligações das cadeias de hemicelulose, o resíduo sólido obtido é constituído basicamente por lignina e celulose. A celulose neste caso pode ser levada à produção exclusiva de glicose, empregada na produção de polpa de papel ou de químicos, como etanol ou ácido lático via fermentação, por exemplo. A fração hemicelulósica possui potencial para ser empregada, após neutralização, na conversão para xilitol devido ao seu alto teor de xilose. Contudo, hidrolisados com baixo teor de ácido acético ou furfural são requeridos (AGUILAR *et al.*, 2002). Compostos químicos como o ácido lático também são viáveis desde que o microrganismo seja capaz de utilizar xilose com alto rendimento, o que se verifica na espécie *Bacillus coagulans*.

No entanto, em vista de várias possibilidades, o mais interessante seria encontrar um método que produza baixos níveis de inibidores do crescimento microbiano para minimizar os custos do processo com etapa de remoção destes compostos. (CHANDEL *et al.*, 2010) relatam que em seus

estudos com hidrólise ácida de biomassa foram produzidos vários compostos inibidores. Ácidos alifáticos (acético, fórmico e levulônico), furano-derivados e compostos fenólicos foram formados. Furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) são os furanos mais importantes formados pela decomposição de pentoses e hexoses respectivamente. Ácido acético é reportado na hidrólise de grupo acetil das hemiceluloses como consequência da desacetilação de pentosanas acetiladas. Vários compostos fenólicos são derivados da lignina como a vanilina, o ácido vanílico, o álcool vanílico, o ácido 4-hidroxibenzóico, o 4-hidroxibenzaldeído, o ácido cumárico, o syringaldeído, o ácido siríngico, o cinamaldeído, o álcool diidroconiferil, a hidroquinona, o catecol, o veratrole, a acetoguaiacetonona, o ácido homovanílico e as cetonas de Hibbert. O HMF é convertido a uma taxa menor que o furfural, o que pode ser creditado à baixa taxa de permeabilidade da membrana (CHANDEL *et al.*, 2010), mas ambos provocam o aumento na fase lag de crescimento dos microrganismos. O mecanismo de ação inibidora dos compostos fenólicos deve-se à capacidade destes de penetrar nas membranas biológicas e causarem sua perda de integridade, afetando desta forma a habilidade da membrana de servir como barreira seletiva. Já a inibição por ácido acético é creditada ao afluxo de ácido não dissociado no citosol (LARSSON *et al.*, 1999).

De uma forma geral, pode-se verificar que a escolha do método mais adequado para pré-tratamento do resíduo lignocelulósico pode variar de acordo com a finalidade a que este se destina. Além disso, vários outros componentes precisam ser avaliados antes de se definir o processo de pré-tratamento, como demanda/disponibilidade de energia, mão de obra e estrutura produtiva, e todos os itens que afetam diretamente o custo do processo e o preço do produto final.

## 2.4. Biopolímeros e biorrefinarias

Muito menor em escala, mas potencialmente maior em impacto econômico, é o uso de biomassa para produção de bio-materiais. Esta aplicação é há muito utilizada, desde o tempo no qual a biomassa tem sido usada para construção, vestuário, produtos industriais, papel e embalagem. Ao longo do último século, materiais baseados na indústria petroquímica se tornaram rapidamente importantes. Contudo, com o aumento do preço do petróleo e diminuição das reservas se tornou necessário reconsiderar o uso de biomassa para produção de uma ampla variedade de materiais. Várias alternativas para energia fóssil estão disponíveis, algumas delas viabilizam o uso de materiais oriundos de biomassa (SCIENCE FORUM, 2009).

O atual cenário econômico parece ser favorável às biorrefinarias: se por um lado tem-se a existência da crescente demanda por produtos ditos de base biológica, por outro, há disponibilidade de fontes renováveis que têm sido subutilizadas. A capacidade global para o mercado de bioplásticos em 2007 foi 0,36 milhões de toneladas e aumentou aproximadamente 40% ao ano, entre 2003 e 2007, A potencial substituição técnica de plásticos de petróleo por bioplásticos é estimada em 90% e sua capacidade global é esperada para alcançar 3,45 milhões de toneladas métricas em 2020 (SHEN *et al.*, 2010). Enquanto isso, um volume de  $17 \times 10^{10}$  toneladas métricas de biomassa é produzido pela natureza anualmente, do qual somente 3,3% são utilizados pela humanidade (THOEN & BUSCH, 2006).

O tamanho do mercado de químicos fósseis existente e o mercado potencial para os químicos de base biológica mostram uma demanda de grande volume no mercado para blocos construtores e biopolímeros (NOWICKI *et al.*, 2008). Além disso, ambiciosas políticas criadas pela União Européia e pelos Estados Unidos apoiam o desenvolvimento do mercado de produtos “bio-based”. Os Estados Unidos tinham como meta a substituição de 12% de matérias primas químicas em 2010 e 25% em 2030 (THOEN & BUSCH, 2006).

A produção de biopolímeros tem experimentado um rápido crescimento na última década devido à preocupação comum com o meio ambiente, com as mudanças climáticas e com a depleção de combustíveis fósseis. Plásticos são os materiais mais amplamente usados e a introdução de bio-plásticos oferecem grandes oportunidades (CAROLE *et al.*, 2004). Comercialmente interessantes, os poli-ésteres podem ser obtidos de açúcar via fermentação. Apesar de o mercado para o Polilactato (PLA), por exemplo, ser ainda pequeno se comparado aos tradicionais polímeros e biomateriais, este demonstrou forte crescimento entre 2003 e 2007

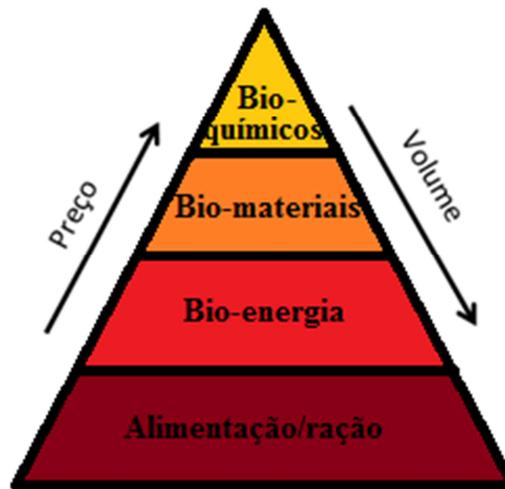
(aproximadamente 40% ao ano). Além disso, o PLA compete economicamente com polímeros fósseis e mostra desempenho igual ou superior a estes, como o polietileno (PET), por exemplo (SHEN *et al.*, 2010).

Os principais mercados para uso de polímeros é o de produção de fibras. A matéria-prima geralmente empregada ainda é o xarope de glicose obtido a partir de milho, cana de açúcar, batata ou trigo (VACA-GARCIA, 2008). Futuramente, espera-se que o PLA seja produzido a partir de matérias-primas lignocelulósicas (CAROLE *et al.*, 2004; DORNBURG *et al.*, 2006). Mas considerando os atuais preços do petróleo, sua produção ainda não é competitiva (LAZERRI, 2009).

Impactos no aumento da produção de biomaterias e aplicações incluem: redução da demanda por combustíveis fósseis; aumento do valor agregado da biomassa; redução das emissões dos gases que contribuem ao efeito estufa (Greenhouse Gas, GHG); desenvolvimento industrial; criação de oportunidades para as áreas rurais, incluindo aumento do número de empregos; redução da toxicidade com conseqüente melhora das implicações na saúde (KAMM & KAMM, 2005).

O conceito de biorrefinaria envolve a missão de otimizar o uso dos componentes vegetais disponíveis, utilizando compostos de alto valor agregado e deixando os compostos remanescentes para geração de energia. Desta forma, a produção de energia não seria apenas prioritária, mas uma aplicação adicional, acrescentando valor econômico global à cadeia produtiva.

Valorização das funcionalidades disponíveis e utilização otimizada do potencial que a biomassa apresenta requer uma seleção criteriosa da matéria-prima a ser utilizada, bem como logística e refinaria. O que requer cadeias “multi-input” e “multi-output” fazendo uso otimizado das funcionalidades, material e energia disponíveis enquanto oferece ótimas condições econômicas e oportunidades sociais.

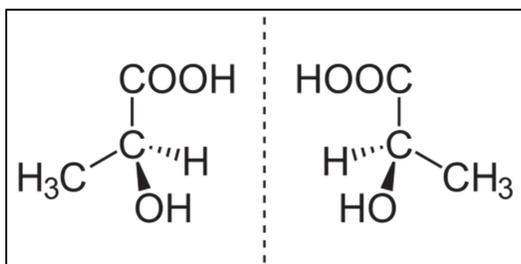


**Figura 5.** Preço de mercado *versus* volume dos “bio-based” produtos. Adaptado de DE JONG *et al.* (2009).

As biorrefinarias devem estar baseadas em economias de escala, assim a produção de co-produtos de pequeno volume de mercado (de base biotecnológica e que não podem ser produzidos nas refinarias convencionais) pode alavancar-se com outros de volume maior (LYND *et al.*, 1999).

## 2.5. Ácido láctico e Polilactato

O ácido láctico é um produto químico versátil e dentre suas aplicações pode-se citar aquelas nas indústrias farmacêuticas, têxteis, de alimentos e de polímeros. Na indústria de alimentos, o ácido láctico possui aplicações na produção de bebidas (no ajuste do pH de cervejas, vinhos e cidras), na formulação de salmouras (para azeitonas, pepinos e produtos lácteos). Na indústria farmacêutica e de cosméticos ele é usado na produção de loções para pele, por exemplo. Além disso, o lactato de cálcio é utilizado como fonte de cálcio na produção de formulações farmacêuticas, em alimentos infantis, em rações para animais e em frutas em conservas. O lactato de sódio pode substituir parcialmente o cloreto de sódio na produção de salsichas. O lactato de ferro é uma fonte de ferro prontamente disponível. O etil-lactato é um solvente excelente para vernizes (NANNINGA, 1983). Segundo o Departamento de Energia dos Estados Unidos (USDOE, 2012), o ácido láctico, é um dos 30 compostos químicos com maior potencial de emprego como blocos construtores produzidos a partir de biomassa (WALTON *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Isômeros L-ácido láctico (à esquerda) e D-ácido láctico (à direita)

O ácido láctico pode ser obtido sinteticamente a partir da hidrólise do lactonitrilo, produzindo uma mistura racêmica. Porém, aproximadamente 90% de todo o ácido láctico produzido mundialmente é obtido via fermentação. A vantagem deste último é permitir a escolha do isômero, L ou D, a ser produzido, o que é definido pela escolha do microrganismo adequado. Via fermentação é possível obter ácido láctico opticamente puro (pureza quiral próxima de 100%), o que é um atributo desejável na indústria de polímeros (HOFVENDAHL & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O ácido láctico é produzido via fermentação de diferentes fontes de açúcar. Algumas indústrias produzem o ácido láctico a partir de milho (NATURE WORKS) outras da cana de açúcar,

do amido de batata e mandioca (PURAC). Entretanto existe grande expectativa sobre o uso de matérias-primas celulósicas para sua produção (SHEN *et al.*, 2010).

NANNINGA (1983) descreve a etapa de purificação do ácido lático na indústria após fermentação. Nesta etapa, a cal é adicionada e o microrganismo é inativado por aquecimento. Após sedimentação e filtração, o ácido lático é liberado pela adição de ácido sulfúrico. O gipso obtido é filtrado e a solução de ácido lático obtida é purificada por resinas de troca-iônica após tratamento com carvão ativado. A etapa de concentração leva à produção de ácido lático comestível. Posteriores etapas de purificação envolvendo esterificação, destilação e hidrólise fornecem um reagente de grau analítico.

Dentre as várias aplicações do ácido lático, aquela que vem experimentando grande atenção se refere a seu uso na produção de biopolímeros ou bioplásticos. SHEN *et al.*, (2010) definem bioplásticos como macromoléculas orgânicas feitas ou processadas pelo homem derivadas de recursos biológicos e utilizados para aplicações como plásticos e fibras (sem papel e cartão). O polilactato está entre os principais bioplásticos emergentes ao lado dos polímeros da celulose, do politrimetileno tereftalato, das poliamidas, dos polihidroxialcanoatos, do polietileno, do polivinilcloreto, dos poliuretanos e dos termosets. Segundo os autores, há praticamente um consenso entre a opinião pública em relação ao meio ambiente de que as mudanças climáticas e a depleção de combustíveis fósseis são a principal razão para o crescimento rápido neste setor econômico-produtivo.

O PLA é um poliéster alifático, produzido via polimerização do ácido lático. Polimerização de L(+)-lactato resulta em PLLA enquanto polimerização de D(-)-lactato resulta em PDLA. A maioria do PLA comercializado é do tipo poli(meso-lactato) que é um mix de L(+)-lactato (>95%) e D(-)-lactato (<5%). O poli(meso-lactato) pode ser usado em uma ampla faixa de aplicações em embalagens (filmes, bandejas, copos, garrafas), fraldas, tecidos, talheres. O PLA possui estrutura altamente amorfa, não apresenta rotação da luz polarizada sendo opticamente inativa. Tecnologia em estereocomplexos tem sido descrita com o objetivo de obter PLA termorresistente. A formação de estereocomplexo entre PLLA e PDLA ocorre quando sequências de unidades L-lactídeo e sequências de unidades de D-lactídeo coexistem em um sistema. A PURAC descreve a síntese como um processo de transesterificação na presença de um catalisador. Materiais iniciadores são separadamente polimerizados em L-lactídeo e D-lactídeo. A estereocomplexação de PLA algumas vezes também é chamada “stereocomplex crystallization” (sc) ou cristalização racêmica. PLLA e

PDLA misturados a uma razão de D/L de 1:1 produz cristais sc-PLA com ponto de fusão ( $T_m$ ) de 210-240 °C, o que é aproximadamente 30–60°C mais alto que a  $T_m$  do PLLA homocristalino (SHEN *et al.*, 2010).

O PLA não é indicado para aplicações que requerem termorresistência, entretanto há relatos do uso de tecnologia de estereocomplexação para produção de PLA com melhorias neste aspecto. Este processo é chamado de cristalização racêmica. A formação de estereocomplexo ocorre quando unidades sequenciais de L-lactato e D-lactato coexistem num mesmo sistema. Uma mistura de PLLA e PDLA na razão de 1:1 produz cristais de PLA com temperatura de fusão entre 210-240°C, o que é 30-60°C mais alto que o PLLA homocristalina. Desta forma, novas aplicações já são vislumbradas para o emprego de polímeros constituídos de *blends* de PLA como na área de transportes e aparelhos elétricos e eletrônicos (SHEN *et al.*, 2010).

Alguns autores sugerem que o PLA é uma alternativa viável aos plásticos derivados de petróleo (DRUMRIGHT *et al.*, 2000), pois compete economicamente com polímeros fósseis e mostra igual ou superior desempenho que polímeros fósseis como o polietileno (PET). Os principais mercados são os de embalagens e fibras para preenchimento. A matéria-prima é o xarope de glicose obtida de milho, cana de açúcar, batata ou trigo (VACA-GARCIA, 2008). Futuramente, espera-se que PLA possa ser produzido de matérias-primas lignocelulósicas (CAROLE *et al.*, 2004; DORNBURG *et al.*, 2004). Para reduzir o custo do ácido láctico têm se verificado a possibilidade de utilização de resíduos, subprodutos gerados pela indústria agrícola (PATEL *et al.*, 2005). Neste contexto, estuda-se a possibilidade da utilização da palha ou bagaço da cana de açúcar. O que permite, além de tudo, a não competição direta com a produção de alimentos, alternativa para a utilização otimizada do resíduo agrícola e não geração de poluentes.

## 2.6. Biodegradabilidade do Polilactato

Os polímeros biodegradáveis são concebidos para resistir a um número de factores ambientais durante a utilização, mas para ser biodegradável em condições de compostagem.

A maioria dos substitutos dos polímeros sintéticos são polímeros biodegradáveis. Os polímeros biodegradáveis mais comumente utilizados são os poliésteres alifáticos, tais como ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), óxido de polietileno (PEO), poli-3-hidroxibutirato (PHB) e ácido poliglicólico (PGA).

A biodegradação de ácido poliláctico (PLLA) foi estudada em diferentes temperaturas elevadas em condições de estado, tanto aeróbios e anaeróbios, aquático e sólido. No teste de headspace aeróbica/aquática a mineralização do PLLA foi muito lento à temperatura ambiente, mas mais rápido sob condições termofílicas. O efeito claro da temperatura sobre a biodegradabilidade dos PLLA nos testes aquáticos indica que a sua estrutura de polímero tem de ser hidrolisado para os microorganismos poderem utilizá-lo como uma fonte nutriente. Em semelhantes temperaturas elevadas, a biodegradação de PLLA foi muito mais rápida em condições anaeróbicas em estado sólido do que em condições aeróbias aquáticos. O comportamento de PLLA no processo de compostagem natural mostrou-se semelhante ao que nos ensaios de biodegradação aquáticos, a biodegradação se iniciou apenas após o início da fase termofílica. Estes resultados indicam que o PLLA pode ser considerado como um material compostável, sendo estável durante a utilização a temperaturas mesofílicas, mas degradável rapidamente durante a eliminação de resíduos em composto ou instalações de tratamento anaeróbicas (ITÄVAARA *et al.*, 2002).

Dois homopolímeros, PLLA e PLDA, formam a mistura sintética PLLDA, que é um polímero semi cristalino. PLLDA é um polímero amorfo tendo uma distribuição aleatória de ambas as formas isoméricas de ácido láctico e, assim, não é capaz de prover uma estrutura cristalina durante o processamento de solidificação. A cinética de degradação da PLLA é muito mais lenta do que a de PLLDA. Em alguns estudos a degradação completa de PLLA tem sido relatada como sendo maior do que 2 anos *in vitro* e *in vivo*. Copolímeros de L-lactato com DL-lactideo tem sido produzidas com o objetivo de romper a cristalinidade de L-lactato e acelerar assim o processo de biodegradação.

O processo de biodegradação dos polímeros começa por difusão de água no interior do material, a hidrólise quebra as cadeias poliméricas, o que resulta em menos resistência e diminuição da estabilidade estrutural e química. Sinérgica à hidrólise, as enzimas lisossômicas e

encapsulamento fibroso também participam do processo de biodegradação dos polímeros. A degradação *in vivo* e *in vitro* produz ácido lático e monómeros de ácido glicólico, que são metabolizados em dióxido de carbono e água, e são subsequentemente eliminados através do ciclo do ácido tricarbóxico. O processo tem uma cinética mais elevada nas zonas amorfas do polímero, aumentando a fração de zonas cristalinas, mais resistente ao processo de degradação.

Grandes esforços têm sido feitos numa tentativa para melhorar os biomateriais utilizados para aplicações diversas. Estudos com polímeros biodegradáveis têm se concentrado na adaptação de suas propriedades mecânicas e cinética de degradação para atender às diversas aplicações. Os resultados obtidos nos estudos de COIMBRA *et al.* (2008) mostraram que a degradação do PLA se iniciou após 30 dias em simulação *in vitro*, e que o processo continuou até 90 dias de degradação. Em geral, verificou-se que a degradação se iniciou na região amorfa do polímero, e resultou na a exposição de uma camada cristalina mais profunda.

Pelo fato de a degradação dos polímeros acontecerem em uma sequência de passos abióticos e biológicos nos testes padronizados, a determinação de muitas moléculas pequenas pode não ser realista comparada à biodegradação deste polímero na natureza. O teste de regulamentação da “Organisation for Economic Co-operation and Development” (OCDE), por exemplo, denominado “teste de biodegradabilidade inerente ao solo” acompanha liberação de CO<sub>2</sub> durante um período de 64 dias como medida de biodegradação. Este teste só seria relevante quando a degradação abiótica/biótica da sequência inteira de um polímero ocorre sob as condições específicas do teste. Reações subsequentes do monômero, tais como a sua biodegradação e volatilização/degradação atmosférica, provavelmente não seria percebido, também. Em situações em que unidades monoméricas de um polímero não são mineralizadas, mas são incorporados a células em crescimento, um teste simples de evolução CO<sub>2</sub> poderia mostrar este fato. O efeito obtido ao se tentar forçar ajustar os complexos mecanismos de degradação do polímero em um teste simples, regulamentarmente padronizado, significa que uma informação enganosa sobre o destino de um polímero no ambiente poderá ser gerado.

## 2.7. Linhagens produtoras de ácido láctico e rotas metabólicas

### 2.7.1. Bactérias lácticas e a espécie *Bacillus coagulans*

De acordo com KANDLER (1983) o termo bactéria acidoláctica surgiu em meados do século XX (cf. INGRAM, 1975). ORLA-JENSEN (1919) definiram este grupo de organismos o qual, apesar de algumas diferenças, possuem características bem definidas: são bactérias Gram positivas, microaerófilas, não esporulantes e produtoras essencialmente de lactato. Mais recentemente, bactérias ácido-láticas foram definidas como um grupo que não possui taxonomia de bactérias Gram positivas, com baixo teor de GC, não motil, caracterizado pela capacidade de fermentar açúcares a ácido láctico (ZHU *et al.*, 2009). As bactérias ácido láticas (LAB) compreendem microrganismos cocos (*Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*) e bacilos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) e apresentam rota metabólica homo e/ou heterofermentativa. Bactérias lácticas estão naturalmente presentes em matérias-primas, algumas, porém, como as bifidobactérias, colonizam o intestino de seres humanos e animais e estão presentes em suas fezes (KANDLER, 1983).

Bactérias ácido-láticas pertencem a um grupo heterogêneo de microrganismos que contribuem em várias aplicações nas indústrias de alimentos e bebidas, produção de blocos construtores e produtos químicos finos e na indústria farmacêutica (como ácido láctico, polióis e vitamina B). Na indústria de alimentos e bebidas, especificamente, LAB são usadas para fermentação, formação de aroma (URBACH, 1995) e na produção de conservantes (STILES, 1996), aditivos (HUGENHOLTZ, 2007), bacteriocinas (DE VUYST & LEROY, 2007) e exopolissacarídeos (CERNING, 1990; WELMAN & MADDOX, 2003).

*Bacillus coagulans* apesar de sua capacidade de produzir ácido láctico, não é considerada uma bactéria ácido-láctica. Este organismo cresce entre pH 4,0 e 8,0, sendo pH 6,0 seu ótimo de crescimento. A temperatura ótima de crescimento se situa entre 50-55°C, apesar de crescer em uma faixa bastante ampla. Estudos relatam crescimento de *Bacillus coagulans* desde 18°C (BECKER & PEDERSON, 1950) até 55°C (WALTON *et al.*, 2010). Este organismo foi primeiramente isolado e descrito em 1932 e contribui com a elaboração da quinta edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”. De acordo com versão mais recente do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> edition (1994)”, *Bacillus coagulans* é uma espécie de bactéria produtora de ácido láctico contida no gênero *Bacillus*. É uma bactéria Gram positiva, Nitrato redutase negativa, formadora de endosporo, possui hastes móveis (0,9 µm por 3 µm a 5 µm de

tamanho), apresenta-se de aeróbica a microaerófila. Pode parecer Gram negativa quando entrando na fase estacionária de crescimento. Inicialmente, foi considerada como sendo um *Lactobacillus* formador de esporos. Uma vez que *Bacillus coagulans* exibe características típicas de ambos os gêneros, *Lactobacillus* e *Bacillus*, sua posição taxonômica entre as famílias *Lactobacillaceae* e *Bacillaceae* foi exaustivamente discutida. Entretanto, na sétima edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, ela foi finalmente transferida para o gênero *Bacillus*. Tecnologia baseada em aspectos genéticos foi usada para distinguir os dois gêneros de bactéria morfológicamente similares com características fisiológicas e bioquímicas parecidas.



**Figura 7.** Imagem da cepa *Bacillus coagulans* 162 obtida por microscopia ótica, aumento de 500x.

*Bacillus coagulans* é frequentemente descrita como *Lactobacillus sporogenes* ou como uma bactéria probiótica ácido-lática formadora de esporos, mas esta denominação já está ultrapassada desde que sua taxonomia mudou em 1939. Por definição, bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) não formam esporos. Por isto, utilizar o nome *Lactobacillus sporogenes* é cientificamente incorreto.

Alguns estudos mostraram que *Bacillus coagulans* pode crescer em pH 5,0 e 50°C produzindo L (+) ácido láctico homofermentativamente usando glicose, xilose e arabinose presentes em hidrolisado hemicelulósico obtido a partir da hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do bagaço da cana de

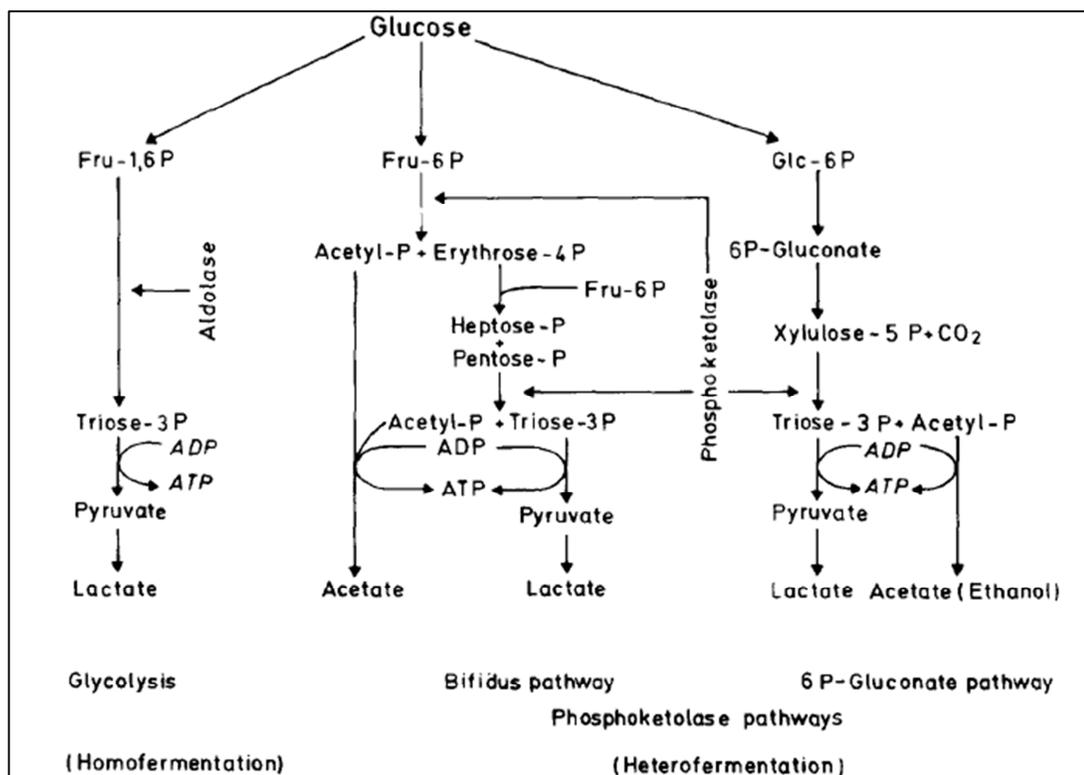
açúcar (LITCHFIELD, 2009). As condições de temperatura e pH ótimas para o crescimento de *B. coagulans* são próximas àquelas de atividade ótima das enzimas celulolíticas, o que o torna adequado para sistemas de operação do tipo sacarificação e fermentação simultâneos (SSF) (RHEE *et al.*, 2007). Além disso, organismos termofílicos são mais adequados para processos industriais mais inóspitos para a grande maioria de microrganismos prováveis contaminantes. Sua habilidade em utilizar uma ampla variedade de açúcares sob condições termofílicas o faz adequado para conversão de biomassa lignocelulósica (WALTON *et al.*, 2010). Hexoses e pentoses podem ser usadas para produção de ácido lático, e o rendimento depende estritamente da rota metabólica utilizada pelo microrganismo, que pode variar de acordo com as condições do meio no qual o organismo se desenvolve. Esta linhagem mostrou em vários estudos que pode eficientemente converter pentoses e hexoses, principais açúcares do hidrolisado hemicelulósico (ARISTIDOU & PENTTILÄ, 2000).

Foram desenvolvidas linhagens recombinantes produtoras de ácido lático com alta pureza de quiralidade (>99%) e com requerimentos nutricionais menos complexos que aqueles necessários às bactérias lácticas para crescerem e produzirem isômeros (D ou L) a partir de meio sintético constituído por açúcar, nitrogênio e nutrientes minerais (LITCHFIELD, 2009).

### **2.7.2. Fermentação de hexose em bactérias lácticas**

Bactérias lácticas são capazes de usar, na fermentação de hexoses, ambas as rotas metabólicas, homo ou heterofermentativa. Existem três maiores rotas metabólicas para conversão de hexoses: Glicólise<sup>1</sup>, via Bifidus<sup>2</sup> e via do 6-Fosfogluconato<sup>3</sup>. Elas possuem em comum o fato de que somente hexoses fosfato com configuração de glicose são atacadas, diferindo umas das outras na forma como dividem o esqueleto de carbono conduzindo a diferentes conjuntos de produtos finais (KANDLER, 1983).

A via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou glicólise é uma via homofermentativa e ocorre em *Streptococci*, *Pediococci* e *Lactobacilli* homofermentativos. Por esta via, um mol de glicose gera dois mols de lactato.



**Figura 8.** Principais rotas fermentativas da glicose em bactérias lácticas (Fonte: KANDLER, 1983).

De acordo com a via EMP, o rendimento teórico em ácido láctico, homofermentativamente produzido, é 2 mols de cada 1 mol de glicose (equivalentes a 1 g ácido láctico/1 g glicose).

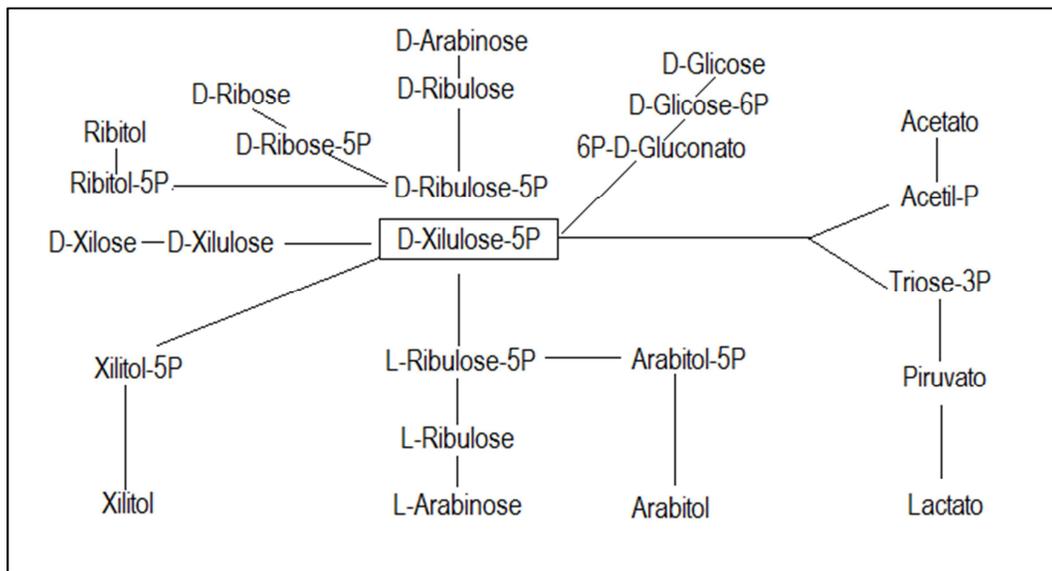
A via Bifidus é uma via heterofermentativa e ocorre em bífido-bactéria. Por esta via, acetato e lactato são formados a uma fração molar de 3:2.

A via da 6-Fosfogluconato é uma via heterofermentativa e ocorre em Leuconostocs e betabactéria. Por esta via, um mol de glicose gera iguais quantidades de CO<sub>2</sub>, lactato e acetato (ou etanol), obtendo fração molar de 1:1:1.

### 2.7.3. Fermentação de pentose em bactérias lácticas

Bactérias lácticas têm apenas rota heterofermentativa para conversão de pentose: a via 6-P-gluconato. Existem inclusive algumas linhagens pentose-negativas. Por esta via um mol de pentose produz um mol de lactato e um mol de acetato, obtendo-se fração molar igual a 1:1.

Pela via das Fosfoquetolases (PK), heterofermentativamente, na assimilação de pentose, somente 1 mol de ácido láctico é obtido de 1 mol de xilose ou arabinose (equivalente a 0,6 g de ácido láctico por g de xilose ou arabinose).



**Figura 9.** Dissimilação de pentoses em bactérias lácticas. Adaptado de KANDLER (1983).

A D-xilulose-5-fosfato (**Figura 9**) é o intermediário comum da fermentação de pentoses e glicose e a necessidade de fosfoquetolase para a fermentação sugere que somente bactérias lácticas heterofermentativas são capazes de utilizar pentoses.

#### 2.7.4. Fermentação de hexose e pentoses em *Bacillus coagulans*

A espécie *Bacillus coagulans* é capaz de utilizar glicose e pentoses (xilose e arabinose) para produção de ácido láctico, ambas por via homofermentativa.

Apesar de utilizar um rota metabólica ainda não completamente explicada, a *B. coagulans* 162 é um microrganismo capaz de utilizar uma via alternativa para conversão de pentoses homofermentativamente convertendo 3 mols de pentose em 5 mols de ácido láctico sem formação de etanol ou ácido acético. Esta vantagem, confirmada pelo alto rendimento e produtividade, aliada a outras características como tolerância a agentes inibidores e não ser patogênica (ou GRAS) pela FDA faz com que a linhagem *B. coagulans* seja uma potencial candidata para uso em aplicação industrial.

É possível resumir o metabolismo de ácido láctico em relação a LAB e *Bacillus coagulans* pela **Tabela 2**.

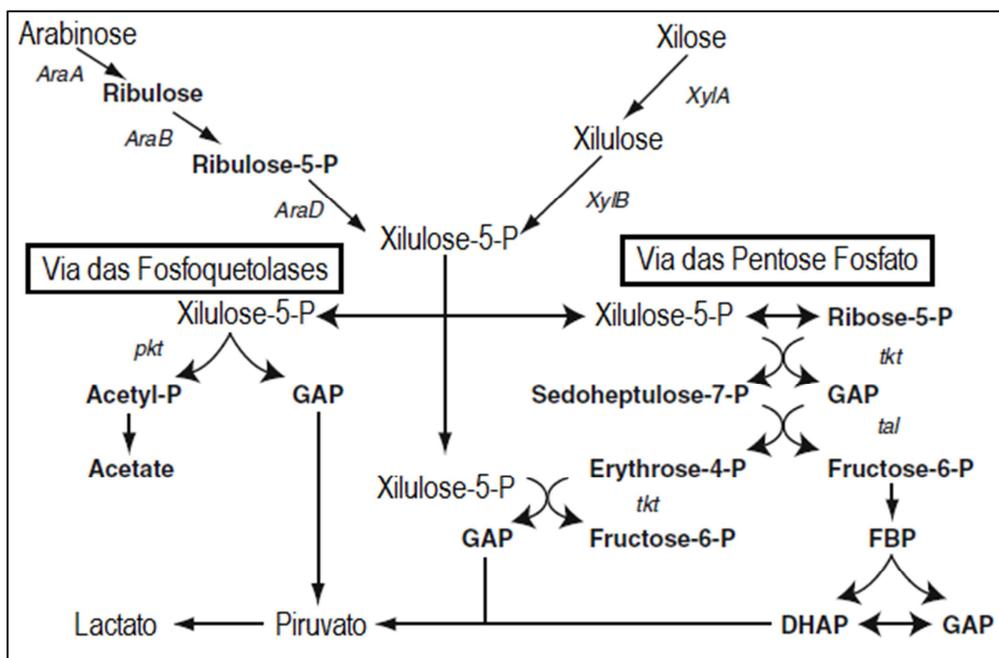
A via das Pentose-fosfato leva à formação de ácido homolático, enquanto a via da Fosfoquetolase produz quantidades molares iguais de lactato e acetato. Desta forma, pela via

heterofermentativa a máxima eficiência teórica que se pode obter na conversão de pentose em ácido láctico é igual a 60%.

**Tabela 2.** Principais rotas metabólicas utilizadas por bactérias lácticas e pela espécie *Bacillus coagulans* envolvidas na conversão em ácido láctico.

microrganismo	fermentação	rota metabólica	substrato	produto (rendimento teórico)
Bactérias lácticas	Homo	Glicólise	hexose	Lactato (1)
	Hetero (via das fosfoquetolases)	Via Bifidus	hexose	Acetato:lactato (3:2)
		Via 6P-gluconato	hexose	Lactato:acetato/etanol:CO <sub>2</sub> (1:1:1)
		Via 6P-gluconato	pentose	Lactato:acetato (1:1)
<i>Bacillus coagulans</i>	Homo	Glicólise	hexose	Lactato (2)
		Via das Pentose-fosfato	pentose	Lactato (2)

D-xilose não é prontamente utilizada como a D-glicose para a produção de compostos químicos por microrganismos (JEFFRIES, 1983) e a razão possivelmente está na rota bioquímica usada para metabolismo de pentose e hexose. A maioria das bactérias anaeróbicas converte D-xilose em D-xilulose-5-fosfato, que é posteriormente catabolizado pela via das pentoses fosfato ou pela via da fosfoquetolase (TEMUDO *et al.*, 2009).



**Figura 10.** Vias metabólicas presentes em bactérias lácticas. Via das Pentoses Fosfato está presente em *Bacillus coagulans*: mecanismo de conversão de pentoses em ácido láctico homofermentativamente.

A via das pentoses fosfato engloba uma série de reações onde D-xilulose-5-fosfato é rearranjada e convertida em gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário do metabolismo da glicose.

A via das fosfoquetolase cliva a D-xilulose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e acetil fosfato, este posteriormente convertido em acetato gerando um ATP (TANAKA *et al.*, 2002).

Apesar da via das pentose fosfato ser a mais comum, várias bactérias têm a capacidade de utilizar a via das fosfoquetolases (TEMUDO *et al.*, 2009).



### 3. SELEÇÃO DO MICRORGANISMO

---

#### 3.1. Resumo

Várias linhagens de bactérias, isoladas do meio ambiente (compostagem, silagem e solo) ou obtidas de bancos de culturas foram testadas quanto à habilidade de produzir ácido lático a partir de xilose, glicose e arabinose, principais açúcares encontrados no hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar.

Inicialmente, 26 linhagens foram selecionadas com auxílio do API system, um sistema que permite avaliar quais linhagens possuem a habilidade de utilizar xilose e arabinose em suas rotas metabólicas, e não somente glicose. Este teste permite reconhecer linhagens capazes de acidificar o meio em condições anaeróbicas. A vantagem deste método é sua relativa simplicidade e rápida resposta. Entretanto, ele possui a limitação de não fornecer dados suficientes para obtenção dos valores de velocidade específica de formação de produtos e/ou consumo de substrato, produtividade, rendimento e taxas de conversão. Este teste permitiu a seleção de 17 linhagens para experimentos posteriores em frascos agitados.

O objetivo dos testes em frascos agitados foi identificar as linhagens capazes de utilizar meio MRS modificado contendo glicose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), xilose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), arabinose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) ou os três açúcares em igual concentração ( $6,7 \text{ g L}^{-1}$ ) para produzir ácido lático. A limitação deste método consiste em subestimar a conversão em ácidos, uma vez que, em ambiente aerado, o microrganismo tende a produzir mais células em detrimento do produto final. Além disso, a amostragem frequente é praticamente inviável. Contudo o método é simples e fornece respostas preliminares que norteiam os experimentos seguintes em biorreator. Por meio dos experimentos com frascos agitados sete linhagens foram selecionadas para prosseguir em testes em regime de batelada, em biorreator com meio de cultivo sintético: *Bacillus coagulans* 162, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, ATB49 e ATB34.

Utilizando experimentos em biorreator foi possível obter os parâmetros cinéticos necessários para escolha do melhor microrganismo produtor de ácido lático em meio sintético visando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar. O objetivo dos testes em biorreator foi obter valores de máximo rendimento ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) em condições de

crescimento estritamente controladas (pH, aeração e temperatura). Além disso, esta etapa permitiu classificar as linhagens em relação a sua habilidade em utilizar a via homo ou heterolática.

A bactéria *Bacillus coagulans* 162 alcançou  $Y_{p/s}$  igual a 0,95 e  $Q_p$  igual a  $2,13 \text{ g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$  e foi selecionada para fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar, devido ao seu desempenho no uso de pentoses.

## 3.2. Materiais e métodos

### 3.2.1. Microrganismos e manutenção

As linhagens *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* e *Bacillus coagulans* 162 foram adquiridas do “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” (DSMZ), Braunschweig, Alemanha.

As linhagens ATB13, ATB14, ATB18, ATB26, ATB27, ATB31, ATB34, ATB41, ATB49, ATB50, ATB51, ATB53, ATB54, ATB55, ATB59, ATB96, ATB121 e ATB122 foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Biotecnologia do Instituto Leibnitz de Engenharia Agrícola – ATB, localizado em Potsdam, Alemanha. As bactérias selvagens foram isoladas de silos, resíduos orgânicos em compostagem e do solo pelo próprio ATB.

**Tabela 3.** Microrganismos testados utilizando API system e suas respectivas temperaturas ótimas de crescimento

Microrganismo	Temperatura de incubação
<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus coryniformis</i>	30°C
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	37°C
<i>Bacillus coagulans</i> 162, ATB13, ATB14, ATB18, ATB26, ATB27, ATB31, ATB34, ATB41, ATB49, ATB50, ATB51, ATB53, ATB54, ATB55, ATB59, ATB96, ATB121, ATB122	52°C

Para fins de estocagem, as bactérias lácticas foram liofilizadas e armazenadas a -80°C.

Para ativação das culturas, as bactérias liofilizadas foram inoculadas em tubos de ensaio (5 mL) contendo 2 mL de caldo MRS (De Man *et al.*, 1960) composto por: peptona (10 g L<sup>-1</sup>); extrato de carne (10 g L<sup>-1</sup>); extrato de levedura (5 g L<sup>-1</sup>); dextrose (20 g L<sup>-1</sup>); polissorbato 80 (1 g L<sup>-1</sup>); citrato de amônio (2 g L<sup>-1</sup>) acetato de sódio (5 g L<sup>-1</sup>); pH 6,4 (medido a 25°C). Os tubos foram incubados adequadamente à temperatura ótima de crescimento de cada espécie por 24h.

Para manutenção das bactérias ativadas, uma alçada do meio fermentado foi espalhada sobre a superfície solidificada do meio de cultivo MRS previamente descrito, contendo ágar (10 g L<sup>-1</sup>), contido em

tubos de ensaio inclinados. Após o crescimento das culturas, os tubos de ensaio foram cobertos com vaselina estéril. Os tubos de ensaio foram estocados a +8°C e sub cultivados mensalmente.

### **3.2.2. Teste em sistema API**

Teste API (Analytical Profile Index Test), bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO, USA, é um sistema que associa 50 testes bioquímicos para o estudo do metabolismo de carboidrato em microrganismos. Consiste em 50 microtubos usados para estudar a fermentação de substratos pertencentes à família dos carboidratos e seus derivados (heterosídeos, poliálcoois e ácidos urônicos). O gênero *Lactobacillus* foi cultivado em meio API 50 CHL e o gênero *Bacillus* em meio API 50 CHB/E. Durante a incubação, a produção de ácidos é observada pela mudança de cor na placa revelada pelo indicador de pH. O primeiro tubo, não contendo nenhum ingrediente ativo, é usado como controle negativo. Cada placa é constituída por 5 placas menores contendo 10 tubos enumerados, cada tubo contendo um substrato diferente. A suspensão bacteriana foi distribuída nos tubos usando-se uma pipeta estéril. Após 24 e 48 h de incubação cada tubo foi lido como positivo (+), negativo (-) ou duvidoso (?) em relação à mudança de cor.

### **3.2.3. Fermentação em frascos agitados**

#### **3.2.3.1. Microrganismos**

Os microrganismos *Bacillus coagulans* 162, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e as espécies isoladas ATB13, ATB14, ATB34, ATB41, ATB49, ATB50, ATB51, ATB53, ATB55, ATB59 e ATB96 foram selecionadas para os testes em frascos agitados.

#### **3.2.3.2. Meio de cultivo**

As linhagens selecionadas foram cultivadas em meio MRS modificado conforme descrito por VENUS (2006). O meio de cultivo, denominado meio MRS<sub>GAX</sub>, foi adaptado para conter pentoses e era composto por: extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>); sulfato de magnésio (0,1 g L<sup>-1</sup>); sulfato de manganês (0,05 g L<sup>-1</sup>); D-glicose (6,7 g L<sup>-1</sup>); D-xilose (6,7 g L<sup>-1</sup>) e L-arabinose (6,7 g L<sup>-1</sup>).

Paralelamente, também foram preparados meios de cultivos contendo exclusivamente como fontes de açúcares D-glicose (20 g L<sup>-1</sup>), D-xilose (20 g L<sup>-1</sup>) ou L-arabinose (20 g L<sup>-1</sup>), os quais foram denominados MRS<sub>GLI</sub>, MRS<sub>XIL</sub> e MRS<sub>ARA</sub>, respectivamente.

Soluções concentradas de açúcares e nutrientes foram esterilizadas individualmente para evitar reações de escurecimento não enzimático e consequente geração de inibidores do crescimento microbiano. A esterilização ocorreu em autoclave a 118°C por 15 min. O pH dos meios se situou na faixa de 6,2-6,5.

### **3.2.3.3. Fermentação**

Alçadas de células jovens de *B. coagulans* 162 (24 h) cultivado em tubos inclinados foram inoculadas em frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL dos meios de cultivo MRS<sub>GAX</sub>, MRS<sub>GLI</sub>, MRS<sub>XIL</sub> e MRS<sub>ARA</sub>. A fermentação foi realizada a 150 rpm, e temperatura ótima de crescimento específica de cada microrganismo testado (**Tabela 2**). Amostras foram retiradas em 0, 24 e 48 h. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **3.2.3.3. Procedimentos analíticos**

Dados sobre consumo de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e produção de ácidos (lático e acético) foram obtidos do meio fermentado. O meio fermentado foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore), convenientemente diluído em água deionizada degaseificada e levado para análise cromatográfica. Amostras não filtradas foram convenientemente diluídas e utilizadas para contagem celular.

#### **3.2.3.3.1. Determinação de açúcares**

Glicose, xilose e arabinose foram determinadas por cromatografia em HPLC equipamento Ultimate 3000 (Dionex), coluna Eurokat PB (300x8mm, 10 µm), usando água bidestilada como fase móvel a um fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 75°C e 30 bar de pressão. Foi utilizado detector RI-71 (Shodex), equipado com injetor automático GINA 50T (Dionex). Foi utilizado volume de injeção igual a 10 µL.

#### **3.2.3.3.2. Determinação de ácidos**

A determinação de ácido lático e ácido acético foi realizada em HPLC equipamento Ultimate 3000 (Dionex), column Eurokat H (300x8mm, 10 µm) (Knauer), usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N como fase móvel com fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 35°C e 65 bar de pressão. Foi utilizado detector RI-101 (Shodex), equipado com injetor automático WPS-3000TSL Analytical. Foi utilizado volume de injeção igual a 10 µL.

### **3.2.3.3.3. Determinação de células totais e viáveis**

O número de células totais foi obtido por contagem microscópica em câmaras de NEUBAUER.

O número de células viáveis foi obtido por contagem em placas de Petri contendo MRS ágar padrão. Amostras do meio fermentado foram convenientemente diluídas e espalhadas sobre a superfície solidificada do meio de cultivo. As placas de Petri foram incubadas às respectivas temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos testados por 24 h.

### **3.2.4. Fermentação em Biorreator**

#### **3.2.4.1 Microrganismos**

Em experimentos usando biorreator foram utilizados os microrganismos *Bacillus coagulans* 162, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e as linhagens isoladas ATB34 e ATB49.

#### **3.2.4.2. Meio de cultivo**

Em fermentação em biorreator foi utilizado o meio de cultivo MRS<sub>GAX</sub> preparado conforme descrito no item 3.2.3.2.

#### **3.2.4.3. Inóculo**

Uma alçada de células jovens (24 h) foi inoculada em 80 mL de meio de cultivo MRS<sub>GLI</sub> preparado conforme descrito no item 3.2.3.2. O frasco Erlenmeyer (250 mL) foi incubado sob temperatura ótima de crescimento do microrganismo (**Tabela 3**) e agitação de 150 rpm por 24h.

#### **3.2.4.4. Fermentação**

O inóculo (80 mL) foi adicionado ao biorreator contendo 720 mL de meio MRS<sub>GAX</sub> estéril. A fermentação foi realizada em biorreator de 2 L (Newbrunswick BioFlo II, USA) com controle automático de pH e temperatura (Biostat II, USA).

O pH foi mantido em 6 pela adição de NaOH 20%. Amostras foram retiradas a cada 2 h e utilizadas para contagem celular, determinação de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácidos (acético e láctico). Todas as fermentações foram feitas em triplicata e os resultados analisados estatisticamente utilizando o programa Statistica Release 7 (Statsoft).

### 3.2.4.5. Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos obtidos em todos os estudos de fermentação foram obtidos de acordo com as equações que os definem, e que podem ser visualizadas na tabela abaixo:

**Tabela 4.** Relações matemáticas que definem os parâmetros cinéticos obtidos nos estudos de fermentação

<i>Parâmetro</i>	<i>Relação matemática</i>	<i>Unidade</i>
$Y_{X/S}$ (rendimento de células em função do substrato)	$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{dX/dt}{-dS/dt}$	adimensional
$Y_{P/S}$ (rendimento de produto em função do substrato)	$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = \frac{dP/dt}{-dS/dt}$	adimensional
$Q_P$ (produtividade volumétrica)	Cálcido láctico final/ $T_{Total}$	$g L^{-1} h^{-1}$
$\mu_x$ (coeficiente específico de formação de biomassa)	$(1/x) dx/dt$	$h^{-1}$
$\mu_p$ (coeficiente específico de formação de produto)	$(1/x) dP/dt$	$h^{-1}$
$X_0$ (Concentração inicial de células)	$\frac{\text{Massa celular inicial}}{\text{Volume inicial}}$	$g L^{-1}$
$X_{final}$ (Concentração final de células)	$\frac{\text{Massa celular final}}{\text{Volume final}}$	$g L^{-1}$
$r_x$ (Taxa de conversão em células)	$\frac{\text{Massa celular obtida}}{\Delta tempo}$	$g h^{-1}$
$r_p$ (Taxa de conversão em produto)	$\frac{\text{Massa de produto obtida}}{\Delta tempo}$	$g h^{-1}$
$-r_s$ (Taxa de consumo de substrato)	$\frac{\text{Massa de substrato consumida}}{\Delta tempo}$	$g h^{-1}$

#### **3.2.4.5. Procedimentos analíticos**

Amostras retiradas ao longo de todo o processo foram analisadas conforme descrito no item 3.2.3.3.

### **3.3. Resultados e discussão**

#### **3.3.1. API**

Este método permitiu identificar linhagens produtoras de ácido a partir de glicose, arabinose e xilose. Todos os microrganismos testados foram capazes de utilizar D-glicose como fonte de carbono para produção de ácido. Entretanto apenas linhagens selvagens demonstraram habilidade de usar D-xilose e L-arabinose concomitantemente (ATB14, ATB41, ATB49, ATB50, ATB51, ATB53, ATB55, ATB59 e ATB96), como pode ser visto na **Tabela 5** que se segue:

**Tabela 5.** Consumo de diferentes açúcares por algumas linhagens de bactérias produtoras de ácido láctico obtido pelo teste API System. Os símbolos (+), (-) e (?) significam resultados positivo, negativo e duvidoso, respectivamente, em relação à mudança da cor do meio.

Microrganismo	Temperatura de Incubação	tempo (h)	D-Gli	D-Ara	L-Ara	D-Xil	L-Xil
<i>Lactobacillus paracasei</i>	30°C	24	+	-	-	-	-
		48	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	37°C	24	+	-	-	-	-
		48	+	-	-	-	-
<i>Bacillus coagulans</i> 162	52°C	24	+	-	?	?	-
		48	+	-	+	?	-
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	30°C	24	+	-	?	-	+
		48	+	-	+	-	+
<i>Lactococcus lactis</i>	37°C	24	+	-	+	-	-
		48	+	-	+	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	37°C	24	+	-	+	-	-
		48	+	-	+	-	-
ATB13	52°C	24	+	-	?	-	-
		48	+	-	+	-	-
ATB14	52°C	24	+	-	?	?	-
		48	+	-	+	+	-
ATB18	52°C	24	+	-	-	+	-
		48	+	-	-	+	-
ATB26	52°C	24	+	-	-	+	-
		48	+	-	-	+	-
ATB27	52°C	24	+	-	-	+	-
		48	+	-	-	+	-
ATB31	52°C	24	+	-	-	?	-
		48	+	-	-	?	-
ATB34	52°C	24	+	-	-	?	-
		48	+	-	-	+	-
ATB41	52°C	24	+	-	+	+	-
		48	+	-	+	+	-
ATB49	52°C	24	+	-	+	+	-
		48	+	-	+	+	-
ATB50	52°C	24	+	-	+	+	-
		48	+	-	+	+	-
ATB51	52°C	24	+	-	+	?	-
		48	+	-	+	+	-
ATB53	52°C	24	+	-	+	+	-
		48	+	-	+	+	-
ATB54	52°C	24	+	-	+	-	-
		48	+	-	+	?	-
ATB55	52°C	24	+	-	+	+	-
		48	+	-	+	+	-
ATB59	52°C	24	+	-	+	?	-
		48	+	-	+	+	-
ATB96	52°C	24	+	-	+	+	-
		48	+	-	+	+	-
ATB121	52°C	24	+	-	-	?	-
		48	+	-	-	+	-
ATB122	52°C	24	+	-	-	?	-
		48	+	-	-	+	-

Após 24 h foi verificado que praticamente todos os microrganismos já haviam produzido ácido no meio de cultivo. Nenhum deles foi capaz de utilizar D-arabinose em sua rota metabólica, possivelmente devido ao fato de este açúcar não ser encontrado na forma livre em abundância na

natureza, o que não favoreceu a evolução adaptativa dos organismos em meios contendo esta pentose como única fonte de carbono. O isômero L foi o único encontrado nos hidrolisados lignocelulósicos, e mesmo assim em quantidades muito inferiores à D-glicose (constituente da celulose) e D-xilose (principal componente da fração hemicelulósica). Os organismos que apresentaram resposta rápida ou em até 24 h na formação de ácidos foram selecionados para a subsequente etapa de seleção.

### **3.3.2. Fermentação em frascos agitados**

Experimentos realizados em frascos agitados mostraram a habilidade dos microrganismos em metabolizar açúcares convertendo-os em ácido lático (**Tabela 6**).

Experimentos contendo apenas um dos açúcares testados (glicose, xilose ou arabinose) na concentração de 20 g L<sup>-1</sup> foram importantes para observar a habilidade do microrganismo em consumi-lo quando em exclusividade no meio. Sabe-se que os microrganismos possuem preferência catabólica por glicose, uma vez ser este açúcar aquele que fornece maior ganho energético utilizando a glicólise, rota metabólica já estabelecida entre estes organismos. Já o consumo de pentoses necessita ser induzido, o que ocorre somente quando o teor de glicose do meio está baixo e há presença de pentose.

**Tabela 6.** Fermentação de diferentes linhagens de bactérias para produção de ácido lático em frascos agitados e meio contendo inicialmente glicose (6,7 g L<sup>-1</sup>), xilose (6,7 g L<sup>-1</sup>) e arabinose (6,7 g L<sup>-1</sup>).

Microorganismos e temperatura de incubação	Tempo (h)	pH	Ácido lático (g L <sup>-1</sup> )	Ácido acético (g L <sup>-1</sup> )	Glicose (%)	Xilose (%)	Arabinose (%)	Yp/s	Células viáveis (log)
<i>Bacillus coagulans</i> 162 (52°C)	0	6,69	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	4,30
	24	4,68	5,069	0,000	27,10	67,43	80,48	0,61	8,56
	48	4,47	14,86	0,000	0,00	0,00	2,65	0,75	7,30
<i>Lactococcus lactis</i> W4236 (37°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	7,30
	24	3,85	4,625	0,000	0,00	100,00	100,00	0,69	9,30
	48	3,77	4,903	0,000	0,00	100,00	100,00	0,73	8,30
<i>Lactobacillus paracasei</i> (30°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	3,96	2,094	0,313	56,16	98,91	100,00	0,70	8,60
	48	3,64	4,809	0,431	14,53	90,80	92,70	0,71	9,39
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 100 (37°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	3,86	3,114	0,000	0,00	100,00	100,00	0,46	7,30
	48	3,78	4,876	0,000	0,00	100,00	100,00	0,73	7,30
<i>Lactobacillus casei</i> (30°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	3,88	2,564	0,383	56,70	100,00	100,00	0,88	8,90
	48	3,64	5,455	0,703	0,00	100,00	100,00	0,81	9,49
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (30°C)	0	6,69	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	3,54	5,921	0,000	0,00	100,00	100,00	0,88	8,78
	48	3,58	5,957	0,339	0,00	100,00	100,00	0,89	9,23
ATB13 (52°C)	0	6,69	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	5,30
	24	6,31	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	3,30
	48	6,08	0,000	0,000	100,00	98,98	98,11	0,00	5,30
ATB14 (52°C)	0	6,73	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	4,30
	24	6,37	0,000	0,000	97,76	98,54	99,97	0,00	4,60
	48	6,08	0,000	0,000	97,05	97,06	99,60	0,00	3,30
ATB34 (52°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	7,30
	24	5,43	0,000	0,984	0,00	86,42	95,58	0,00	8,60
	48	4,85	0,000	2,963	0,00	17,91	95,55	0,00	7,60
ATB41 (52°C)	0	6,69	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	5,30
	24	6,33	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	5,60
	48	6,10	0,000	0,000	100,00	100,00	98,64	0,00	4,30
ATB49 (52°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	5,30
	24	4,13	0,000	0,496	0,00	99,27	50,40	0,00	8,98
	48	4,15	0,000	3,144	0,00	10,48	0,98	0,00	7,48
ATB50 (52°C)	0	6,69	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	4,22	1,580	0,000	68,00	100,00	100,00	0,73	6,51
	48	4,40	2,992	0,000	45,00	99,28	96,19	0,75	6,30
ATB51 (52°C)	0	6,71	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	5,30
	24	4,38	1,554	0,000	40,58	99,74	99,46	0,39	5,30
	48	4,29	2,202	0,000	38,54	98,71	99,27	0,47	4,30
ATB53 (52°C)	0	6,68	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	4,18	1,960	0,000	55,33	100,00	100,00	0,65	6,50
	48	4,36	2,023	0,000	45,04	100,00	100,00	0,55	6,30
ATB55 (52°C)	0	6,70	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	6,30
	24	4,35	1,918	0,000	41,67	90,46	87,43	0,36	6,11
	48	4,35	1,961	0,000	39,67	91,75	90,80	0,38	5,30
ATB59 (52°C)	0	6,69	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	5,30
	24	4,35	1,877	0,000	56,12	100,00	100,00	0,64	5,79
	48	4,35	1,931	0,000	38,33	95,28	93,71	0,40	5,30
ATB96 (52°C)	0	6,71	0,000	0,000	100,00	100,00	100,00	0,00	4,30
	24	6,37	0,000	0,000	98,42	100,00	100,00	0,00	1,30
	48	6,04	0,000	0,000	98,30	100,00	100,00	0,00	0,00

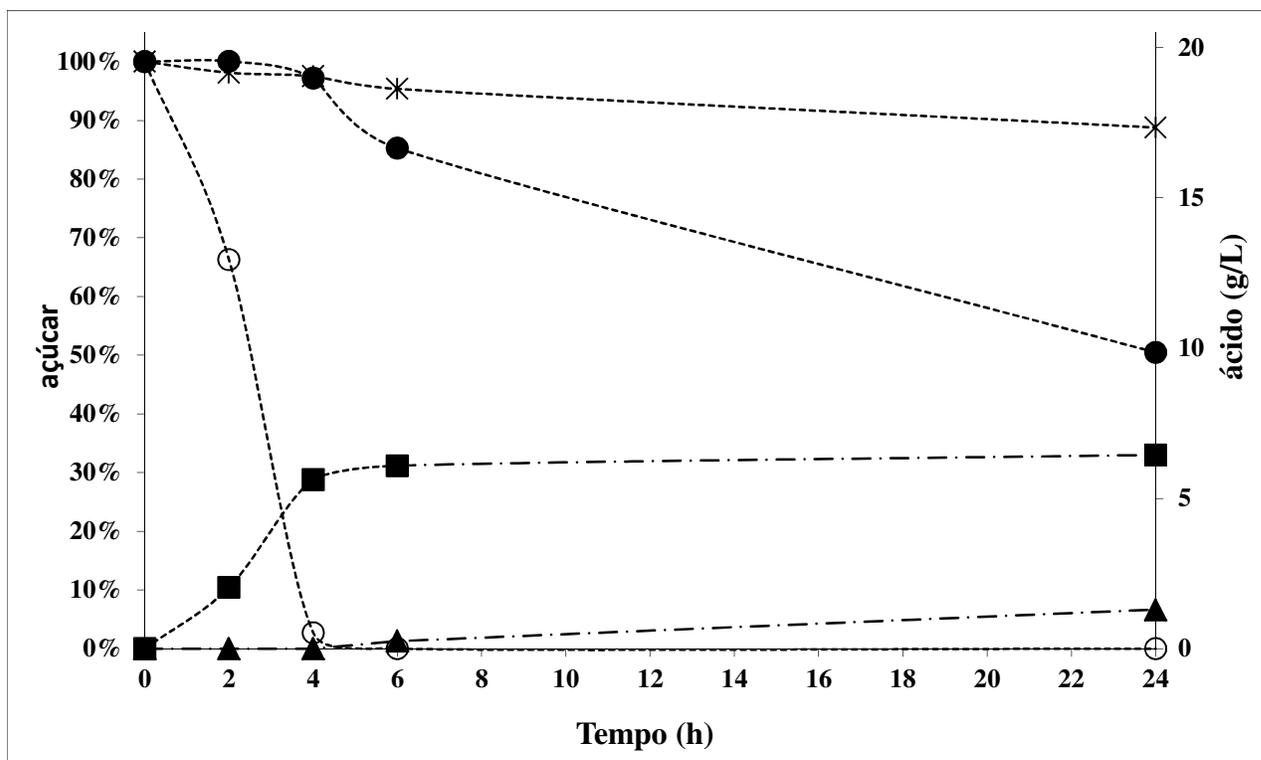
Em todos os ensaios foram utilizados 800 mL do meio de cultura, descrito anteriormente, contendo uma concentração final de açúcares igual a 20 g L<sup>-1</sup> (glicose 6,7 g L<sup>-1</sup>, xilose 6,7 g L<sup>-1</sup> e arabinose 6,7 g L<sup>-1</sup>).

O rendimento ( $Y_{p/s}$ ) foi definido como a massa de ácido láctico obtida dividida pela massa de açúcares totais (soma de glicose, xilose e arabinose) consumida durante a fermentação. O rendimento teórico máximo foi definido como a massa de ácido láctico máxima possível de ser obtida (estequiometricamente) dividida pela massa de açúcares totais presentes no meio (ou a soma de glicose, xilose e arabinose), que neste caso é igual àquele máximo disponível para o microrganismo. Em uma fermentação heterofermentativa o rendimento teórico máximo ( $Y_{p/s}$  teórico) em ácido láctico nesta composição de açúcares seria 0,73 e homofermentativamente igual a 1, Neste caso, considera-se que o rendimento de biomassa ( $Y_{x/s}$ ) seja igual a zero.

### 3.3.3. Fermentação em biorreatores

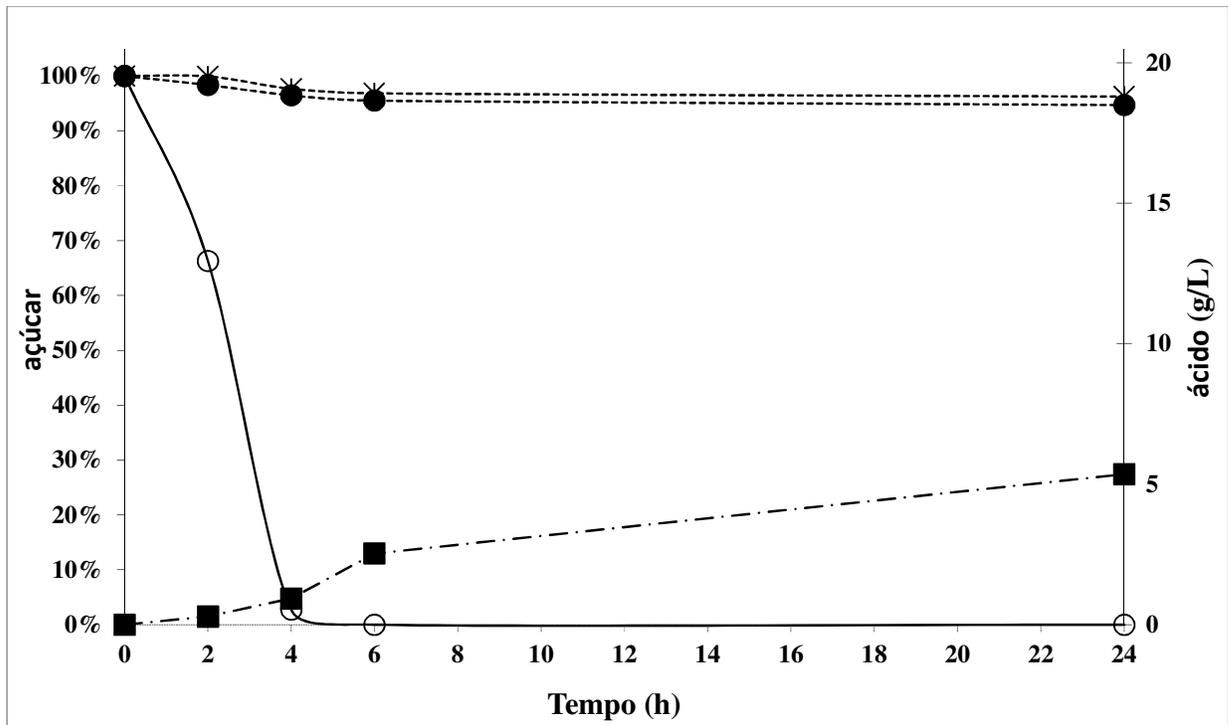
A partir dos resultados em biorreatores o *B. coagulans* 162 foi selecionado para ser testado em biorreator em sistema Fedbatch por ter se mostrado mais eficiente na conversão dos açúcares em ácido láctico, até obtenção da concentração máxima de produto final. As três linhagens, em cujas fermentações, obtiveram maior consumo de NaOH 20% foram ATB49, *B. coagulans* 162 e *L. lactis*.

A linhagem isolada ATB34 (**Figura 11**) produziu 6,45 g de ácido láctico e 1,29 g de ácido acético, consumindo toda glicose (6,7 g), aproximadamente 50% da xilose (3,33 g) e 11% da arabinose (0,73 g) inicialmente presente no meio, obtendo um rendimento ( $Y_{p/s}$ ) de 0,32, Este microrganismo obteve, em 24 h, produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) igual a 0,268 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. A fermentação foi interrompida devido à queda no valor da produtividade volumétrica quando comparado com outras linhagens que se mostraram muito mais eficientes durante este mesmo período de tempo.

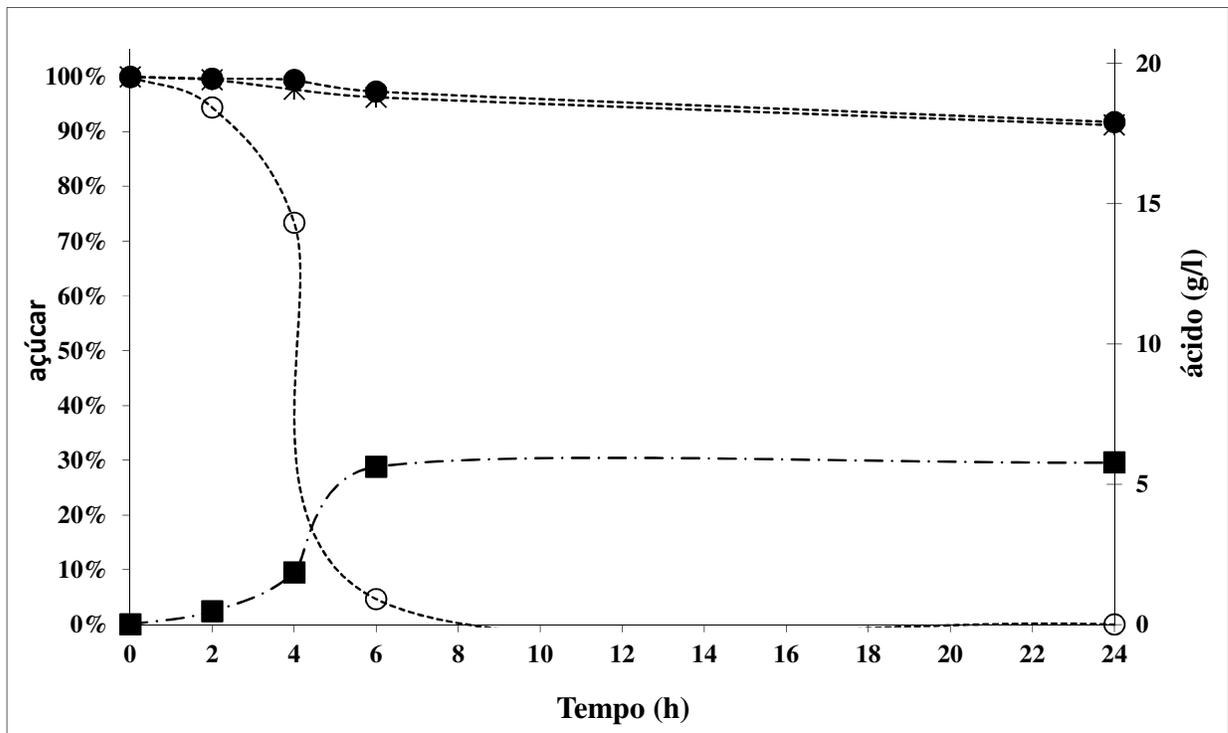


**Figura 11.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem ATB34 em meio  $MRS_{GAX}$  contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido lático, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)

As linhagens *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Figura 12) e *L. rhamnosus* (Figura 13) apresentaram comportamento bastante semelhantes: ambas utilizaram toda a glicose disponível no meio, obtendo massas de ácido lático iguais a 5,36 g após 8 h e 5,77 g após 6 h, respectivamente. Os microrganismos *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. rhamnosus* foram os únicos que não apresentaram produção de ácido acético, porém também não se mostraram eficientes na conversão de pentoses em ácido lático, consumindo menos de 10% dos açúcares arabinose e xilose. Valores similares entre estas espécies também foram encontrados para o rendimento ( $Y_{p/s}$ ) na conversão de açúcares para ácido lático. O  $Y_{p/s}$  e o  $Q_p$  para *Lb. rhamnosus* foram iguais a 0,29 e 0,962 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e para *L. paracasei* subsp. *paracasei*, iguais a 0,27 e 0,669 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

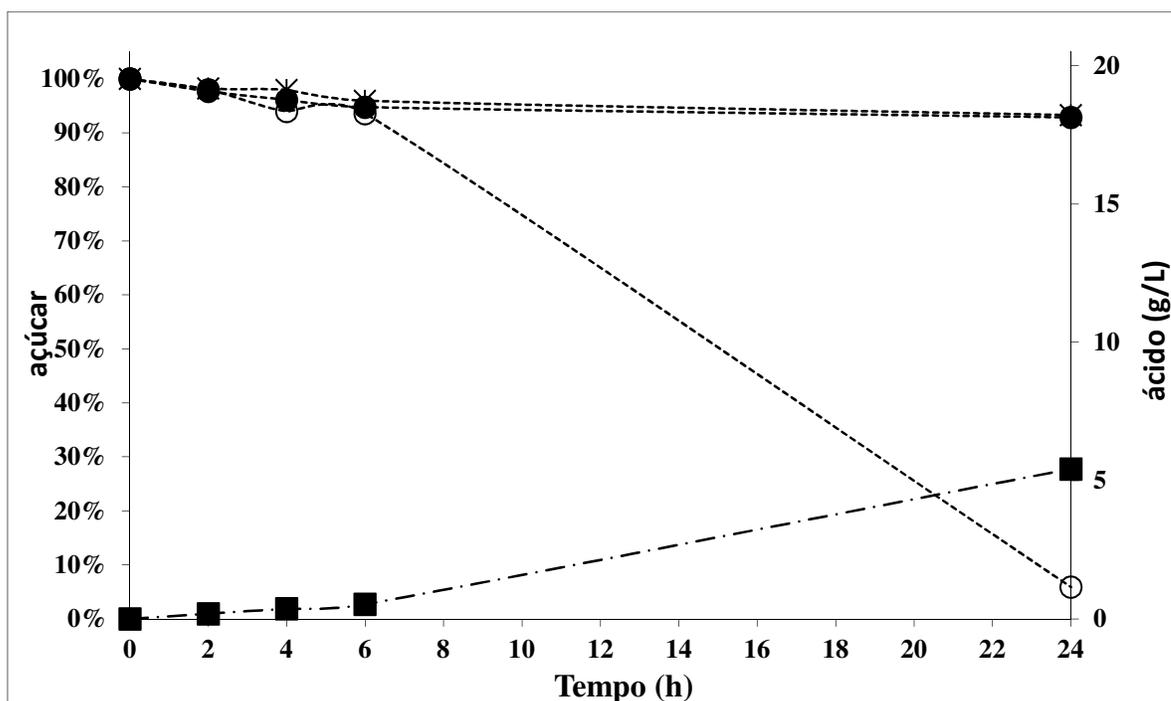


**Figura 12.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem *L. paracasei* subsp. *paracasei* em meio MRS<sub>GAX</sub> contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido lático, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)



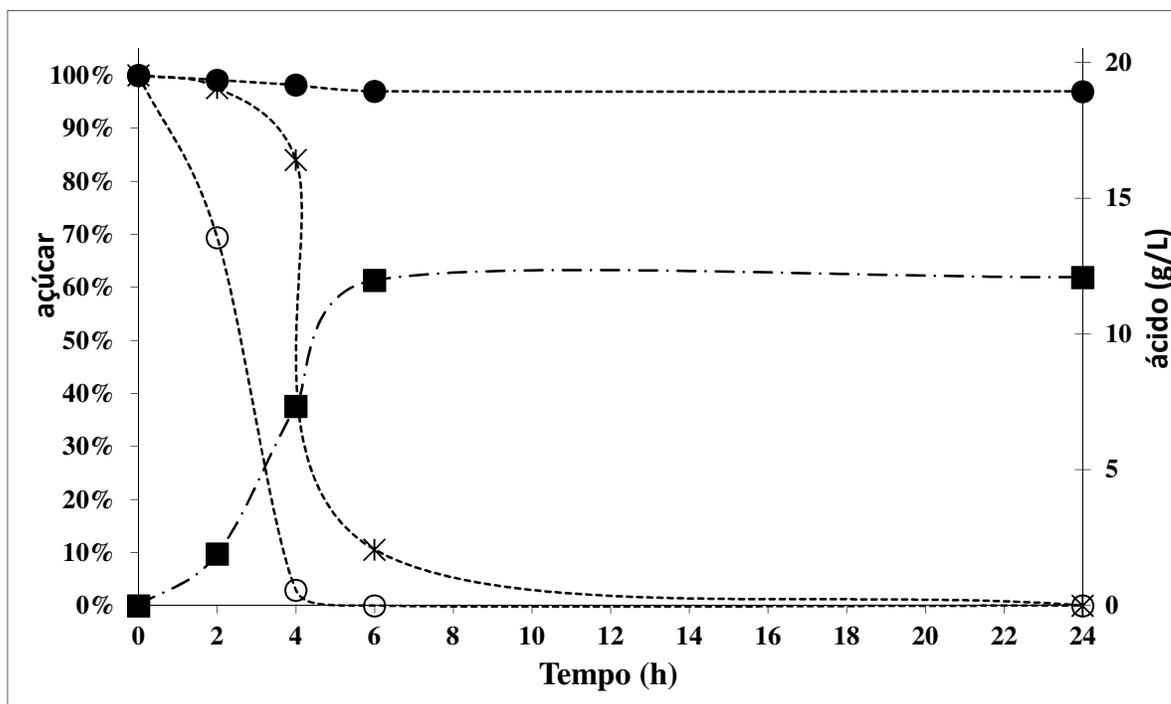
**Figura 13.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem *L. rhamnosus* em meio MRS<sub>GAX</sub> contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido lático, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)

A linhagem *L. paracasei* (**Figura 14**) produziu 5,422 g de ácido lático com  $Y_{p/s}$  e  $Q_p$  iguais a 0,27 e 0,361 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, em aproximadamente 15 h de fermentação. Porém, mesmo em 24 h, esta linhagem não se mostrou capaz de converter todos os açúcares presentes; quantidade residual de glicose foi detectada, bem como praticamente toda a xilose e arabinose.



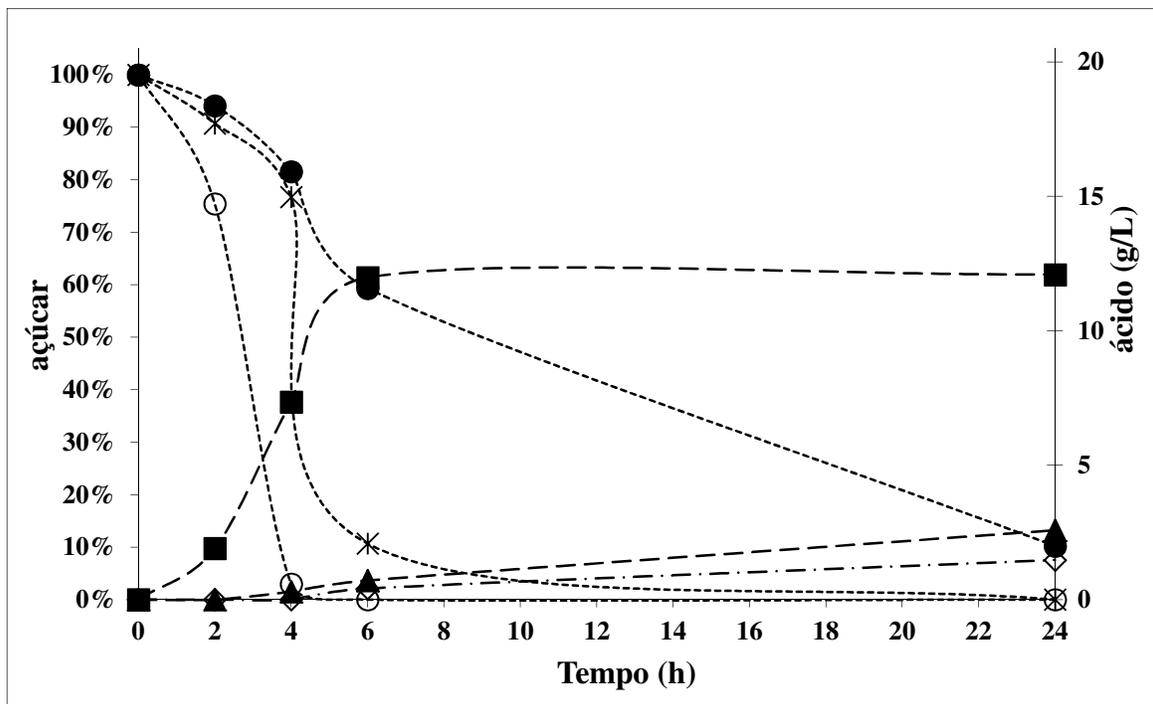
**Figura 14.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem *L. paracasei* em meio MRS<sub>GAX</sub> contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido lático, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)

O *L. lactis* apresentou uma fermentação essencialmente homolática, atingindo o fim em aproximadamente 6 h, com produção insignificante de ácido acético (menor que 5%) e produção quase que exclusiva de ácido lático (12,09 g), fator interessante do ponto de vista econômico. Apesar destas vantagens, não obteve alto rendimento na conversão em ácido lático nem consumo significativo de xilose, remanescendo 6,65 g (aproximadamente 97% da massa inicial) ao final do processo (**Figura 15**). O *L. lactis* mostrou-se eficiente na conversão de arabinose, porém o mesmo não foi observado em relação à xilose, açúcar mais abundante em hidrolisados lignocelulósicos.

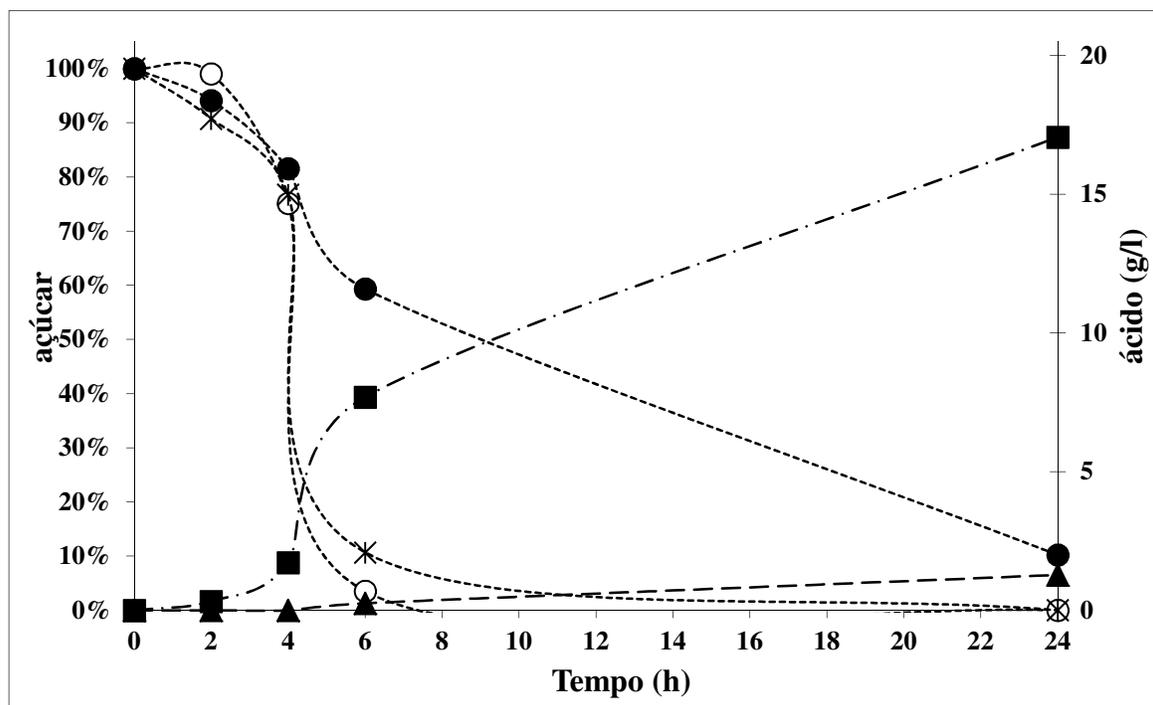


**Figura 15.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem *L. lactis* em meio  $MRS_{GAX}$  contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido lático, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)

Apesar de maior consumo de NaOH 20% para neutralizar os ácidos produzidos, a linhagem ATB49 produziu além do ácido lático (13,75 g), ácido acético em significativa quantidade (2,58 g) em 18 h de fermentação (**Figura 16**). Por outro lado, a bactéria *B. coagulans* 162, que também produziu ácido acético (1,27 g), o fez em quantidades bem inferiores ao ácido lático (17,06 g) e em bem menos tempo, apenas 8 h (**Figura 17**).



**Figura 16.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem ATB49 em meio  $MRS_{GAX}$  contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido láctico, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)



**Figura 17.** Fermentação em biorreator (2 L) utilizando a linhagem *B. coagulans* 162 em meio  $MRS_{GAX}$  contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono. (■ ácido láctico, ▲ ácido acético, × arabinose, ○ glicose, ● xilose)

Assim, em termos de rendimento ( $Y_{p/s}$ ) podemos dizer que no teste em fermentador com meio sintético a melhor linhagem foi o *B. coagulans* 162, com  $Y_{p/s}$  igual a 0,85, seguido pela linhagem isolada ATB49 com  $Y_{p/s}$  igual a 0,69 e pela bactéria *L. lactis* atingido  $Y_{p/s}$  igual a 0,60. Os microrganismos *B. coagulans* 162, ATB49 e *L. lactis* obtiveram produtividades volumétricas ( $Q_p$ ) iguais a 2,132, 0,764 e 2,015 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em todos os casos, a glicose foi utilizada preferencialmente, quando não somente ela e somente depois disso as pentoses foram catabolizadas. Com relação xilose e arabinose não foi observado qualquer relação de preferência quando ambos eram utilizados.

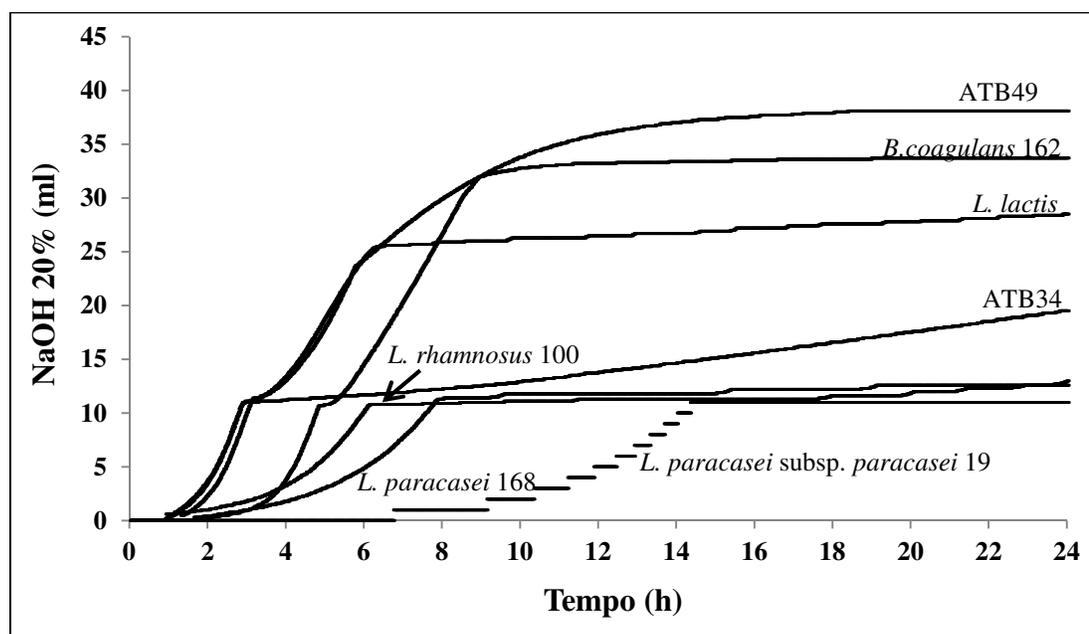
A fermentação em biorreatores foi acompanhada por 24 horas ininterruptas. O pH inicial do meio de cultivo após esterilização se situou em 6,50±0,01 e foi reduzido gradativamente à medida em que o microrganismo produzia ácidos. O pH foi constantemente monitorado e mantido em 6,00 pela adição de NaOH 20%.

A queda abrupta do número de microrganismos viáveis observada nas primeiras duas horas de fermentação em biorreator pode ser creditada à adaptação do microrganismo ao meio, tendo em vista que o inóculo foi cultivado em meio contendo apenas glicose (20 g L<sup>-1</sup>) como fonte primária de açúcar. O número inicial de células viáveis ficou em torno de 10<sup>8</sup> unidades por mL.

**Tabela 7.** Fermentação de diferentes linhagens de organismos produtores de ácido lático em biorreator de 2 L e meio de cultivo sintético contendo glicose (6,7 g L<sup>-1</sup>), xilose (6,7 g L<sup>-1</sup>) e arabinose (6,7 g L<sup>-1</sup>).

Microrganismo e temperatura de incubação	Tempo (h)	pH	Células viáveis (log)
ATB34 (52°C)	0	6,46	8,1
	2	6,00	4,9
	4	6,00	7,1
	6	6,00	7,0
	24	6,00	7,3
ATB49 (52°C)	0	6,55	7,8
	2	6,01	3,4
	4	6,00	5,4
	6	6,00	5,1
	24	6,00	5,2
<i>Bacillus coagulans</i> 162 (52°C)	0	6,48	8,0
	2	6,00	3,2
	4	6,00	5,5
	6	6,00	7,8
	24	6,00	7,9
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> (30°C)	0	6,49	8,1
	2	6,00	5,4
	4	6,00	5,5
	6	6,00	6,1
	24	6,00	6,0
<i>Lactobacillus paracasei</i> (30°C)	0	6,50	8,0
	2	6,36	2,9
	4	6,16	5,5
	6	6,00	5,7
	24	6,00	6,0
<i>Lactococcus lactis</i> (30°C)	0	6,48	8,1
	2	6,00	3,2
	4	6,00	5,5
	6	6,00	7,1
	24	6,00	7,2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (30°C)	0	6,50	8,2
	2	6,00	3,9
	4	6,00	5,5
	6	6,00	5,7
	24	6,00	6,7

O volume de inóculo correspondia a 10% do volume total do meio de fermentação.



**Figura 18.** Consumo de NaOH 20% durante crescimento das linhagens selecionadas em biorreator 2 L.

Pelos gráficos (**Figura 18**) é possível verificar que a linhagem isolada ATB49 e o *B. coagulans* 162 foram as linhagens que apresentaram maior produção de ácidos evidenciado pelo consumo de NaOH 20%. Contudo, ATB49 apresentou maior produção de ácido acético (Tabela 5), o que contribuiu significativamente para o consumo de base, característica não desejável do ponto de vista de processo já que implicaria em custos com separação de produtos e redução da eficiência pelo consumo de substrato com produto não desejável.

**Tabela 8.** Dados obtidos durante crescimento das linhagens selecionadas em biorreator.

Microrganismo	$Y_{p/s}$	$\mu$ global ( $h^{-1}$ )	$Q_p$ ( $g L^{-1} h^{-1}$ )
<i>Bacillus coagulans</i> 162	0,95	3,02	2,13
ATB49	0,69	3,32	0,764
<i>Lactococcus lactis</i>	0,60	3,48	2,010
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,29	1,95	0,963
ATB34	0,32	3,54	0,269
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0,27	1,16	0,361
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	0,27	1,49	0,670

Algumas observações importantes são necessárias para se comparar os resultados apresentados na **Tabela 8**. De acordo com os resultados de  $\mu_p$ , o microrganismo *L. lactis* apresentou o melhor resultado global na taxa de conversão em ácido láctico. Entretanto, esta bactéria utilizou apenas glicose e arabinose em sua rota metabólica. Os valores de  $\mu_p$  para glicose e arabinose foram respectivamente 4,16 e 2,79 h<sup>-1</sup>. Já o *B. coagulans* 162, apesar de não obter o melhor  $\mu_p$  global, foi capaz de utilizar todos os açúcares do meio obtendo  $\mu_p$  para glicose e xilose/arabinose respectivamente iguais a 3,62 e 2,72 h<sup>-1</sup>. Esta característica do *B. coagulans* 162, a de utilizar todas as fontes de açúcar testadas e em especial a xilose, foi fundamental na escolha deste organismo para testes em hidrolisado hemicelulósico.

Vários estudos relatados na literatura suportam a decisão da escolha da linhagem *B. coagulans* trazendo considerações do ponto de vista de processos. Em geral várias bactérias lácticas mesofílicas são usadas para produzir ácido láctico, principalmente aquelas do gênero *Lactobacillus*. Entretanto, linhagens mesofílicas não são as mais indicadas para serem empregadas em ambiente industrial devido ao seu alto risco de contaminação. Utilizando linhagens termofílicas, o ácido láctico pode ser produzido sob condições não estéreis, o que reduz o custo do processo. Por isso, em alguns estudos a espécie termofílica, *Bacillus coagulans*, tem sido utilizada. A temperatura de fermentação deste microrganismo se situa na faixa de 48 a 68°C, situando a temperatura ótima de crescimento e produção de ácido láctico entre 50-52°C. Outras vantagens do *Bacillus coagulans* em relação às conhecidas linhagens de bactérias lácticas é seu requerimento nutricional simples e sua capacidade de formar esporos, o que simplifica a manutenção de culturas e inoculação do meio de fermentação (MICHELSON *et al.*, 2006).

Além disso, baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, *B. coagulans* 162 mostrou-se capaz de utilizar pentoses com alto rendimento e produtividade volumétrica na conversão em ácido láctico.

### 3.4. Conclusão

O método API system se mostrou adequado enquanto método qualitativo e eficaz para auxiliar na seleção dos possíveis candidatos a fermentação eliminando aqueles que não demonstraram qualquer habilidade na conversão de açúcares para produção de ácido.

Em frascos agitados, nas condições estudadas, foi possível determinar o máximo rendimento em ácido láctico após 48 h. Além disso, o ácido acético bem como de glicose, xilose e arabinose consumidos foram determinados. Este experimento permitiu verificar que glicose foi consumida preferencialmente. Entretanto, limitou-se pelo fato de permitir controle da variável pH, que é importante no desempenho das atividades enzimático-fermentativas. A concentração celular inicial se situou na ordem de  $10^5$  e de células viáveis na ordem de  $10^4$ , atingindo valores tão altos quanto  $10^9$  células por mL ao final do processo.

Na fermentação em biorreator, com manutenção do pH 6,0 pela adição de NaOH 20%, foi possível manter as condições ótimas de pH e temperatura durante fermentação. Em regime de batelada *B. coagulans* 162 apresentou  $Y_{p/s}$ ,  $Q_p$  e  $\mu_p$  iguais a 0,95,  $3,02 \text{ h}^{-1}$  e  $2,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivamente. Verificou-se que a produção de ácido láctico é parcialmente associada ao crescimento celular, caracterizada pela formação de produto nas fases de crescimento exponencial e estacionária.

*Bacillus coagulans* 162 mostrou-se o microrganismo com melhor desempenho na produção do ácido láctico e, portanto selecionado para prosseguir com testes em meio hidrolisado do bagaço da cana de açúcar e teste com inibidores.

## 4. CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus coagulans* 162 EM MEIO SINTÉTICO E REGIME DE BATELADA ALIMENTADA

---

### 4.1. Resumo

Este estudo consistiu em descrever a cinética de crescimento do *B. coagulans* 162 em meio de cultivo sintético contendo glicose, xilose e arabinose como principais fontes de carbono para produção de ácido láctico.

A bactéria *B. coagulans* 162 mostrou, em estudo prévio, a habilidade de produzir ácido láctico homofermentativamente a partir de hexose e pentoses com alto rendimento. O objetivo deste estudo foi obter concentração máxima de ácido láctico em regime semi-contínuo de fermentação, bem como os parâmetros cinéticos produtividade volumétrica e eficiência em meio sintético.

O processo foi realizado em duas etapas: a primeira em regime de batelada simples, que se estendeu até completa exaustão de todos os açúcares e estabilização da concentração de ácido láctico do meio e a segunda em regime de alimentação contínua, que se estendeu até decréscimo da velocidade específica de conversão em produtos ( $\mu_p$ ). Durante a primeira etapa, em batelada, a velocidade específica de produção de ácido láctico ( $\mu_p$ ) foi igual a  $3,11 \text{ h}^{-1}$ . A eficiência e a produtividade volumétrica obtidas foram  $0,96$  e  $3,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. A fermentação se iniciou com  $10^6$  células viáveis por mL, alcançando  $10^{10}$  células viáveis por mL ao fim da batelada e finalizando a etapa de alimentação contínua com  $10^{11}$  células viáveis por mL.

Na fase de alimentação contínua foi obtida velocidade específica de produção de ácido láctico igual a  $4,02 \text{ h}^{-1}$ . A eficiência e a produtividade volumétrica obtidas foram iguais a  $0,52$  e  $1,43 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

Neste trabalho foi possível verificar que a produção de ácido láctico é associada e não associada ao crescimento, e ocorre tanto na fase logarítmica de crescimento quanto na fase estacionária. Foi possível ainda observar crescimento diáuxico, caracterizado pelo consumo preferencial da glicose, tendo o consumo da xilose e da arabinose indistintamente se iniciado quando a hexose se esgotou do meio.

## **4.2. Materiais e métodos**

### **4.2.1. Microrganismo**

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Bacillus coagulans* 162, obtida da coleção de microrganismos do Departamento de Biotecnologia do Instituto Leibnitz de Engenharia Agrícola – ATB (Potsdam, Alemanha) e conservada de acordo com o descrito no item 3,2,1,

### **4.2.2. Meio de cultivo**

Na fermentação foi utilizado meio de cultivo MRS<sub>GAX</sub> preparado conforme descrito no item 3.2.3.2.

A solução de açúcares foi esterilizada separadamente para evitar reações de escurecimento não enzimáticas.

A solução nutriente adicionada na segunda etapa da fermentação foi composta por: extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>); sulfato de magnésio (0,1 g L<sup>-1</sup>); sulfato de manganês (0,05 g L<sup>-1</sup>); D-glicose (167 g L<sup>-1</sup>); D-xilose (167 g L<sup>-1</sup>) e L-arabinose (167 g L<sup>-1</sup>).

### **4.2.3. Inóculo**

Uma alçada de células jovens (24 h) foi inoculada em 80 mL de meio de cultivo MRS<sub>GAX</sub> descrito no item 3,2,3,2, contido em frasco Erlenmeyer (500 mL). O frasco foi submetido a 52°C a 150 rpm por 18 h (quando o meio de cultivo atingiu 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup>).

### **4.2.4. Fermentação**

A fermentação foi realizada em biorreator Newbrunswick (USA), com capacidade de 3,5 L de volume útil. Inicialmente, o inóculo (80 mL) foi adicionado a 720 mL de meio estéril contido no biorreator. O pH foi ajustado para 6,0 e mantido constante pela adição de solução de NaOH 20%. O sistema foi submetido à agitação de 150 rpm e temperatura de 52°C.

Ao término da primeira etapa, definido como a paralisação da adição de NaOH 20% ao meio, iniciou-se o bombeamento de solução nutriente para dentro do biorreator.

Amostras de 2 mL foram retiradas a cada 2 h para obtenção da cinética de crescimento microbiano, determinação de ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, glicose, xilose e arabinose.

#### **4.2.5. Procedimentos analíticos**

O meio fermentado foi filtrado em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore), convenientemente diluído e levado para análise em cromatógrafo. Meio não filtrado foi utilizado para contagem celular. Amostras retiradas ao longo de todo o processo foram analisadas conforme descrito no item 3.2.3.3.

##### **4.2.5.1. Determinação de açúcares**

Glicose, xilose e arabinose foram determinadas de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.1.

##### **4.2.5.2 Determinação de ácidos**

Ácidos lático e acético foram determinados de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.2.

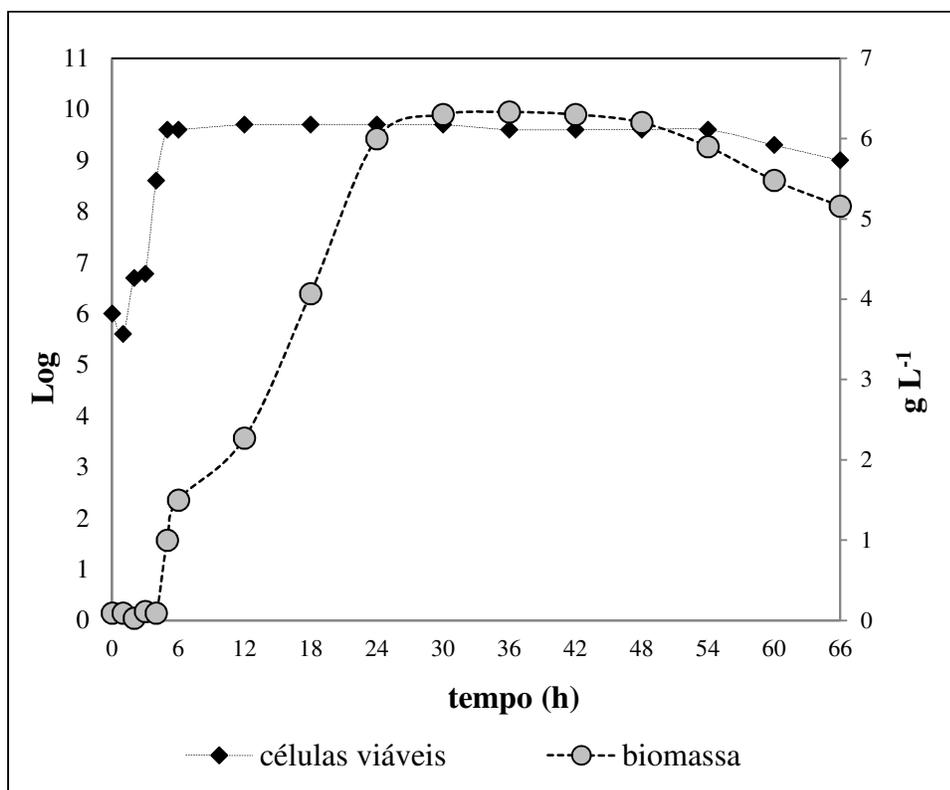
##### **4.2.5.3. Determinação de células totais e viáveis**

Células totais e viáveis foram determinadas de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.3.

### 4.3. Resultados e discussão

O processo de fermentação semi-contínua foi escolhido para produção de ácido lático em meio sintético visando maximizar a concentração do produto. LITCHFIELD (2009) afirma que este regime apresenta-se vantajoso em relação aos demais em termos alcance de alta produtividade (grama de ácido lático por litro por hora). Entretanto, neste regime, observa-se produção alta de biomassa, o que pode comprometer o rendimento em ácido lático. A fermentação foi monitorada pela adição de NaOH 20% ao meio para manutenção do pH 6,0, ótimo para crescimento do *B. coagulans* 162 e a temperatura foi mantida em 52°C.

O crescimento microbiano foi acentuado durante o consumo de pentoses. Sabe-se que a via das pentose-fosfato tem como objetivo produzir NADP e ribose. Apesar de o inóculo ter sido preparado em meio contendo os três açúcares, visando adaptação da linhagem, pequena fase lag foi observada na curva de biomassa. O número de células apresentou crescimento exponencial durante a segunda metade da etapa de batelada (**Figura 20**).



**Figura 19.** Curva de crescimento de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo sintético em biorreator Newbrunswick (USA), com capacidade de 3,5 L.

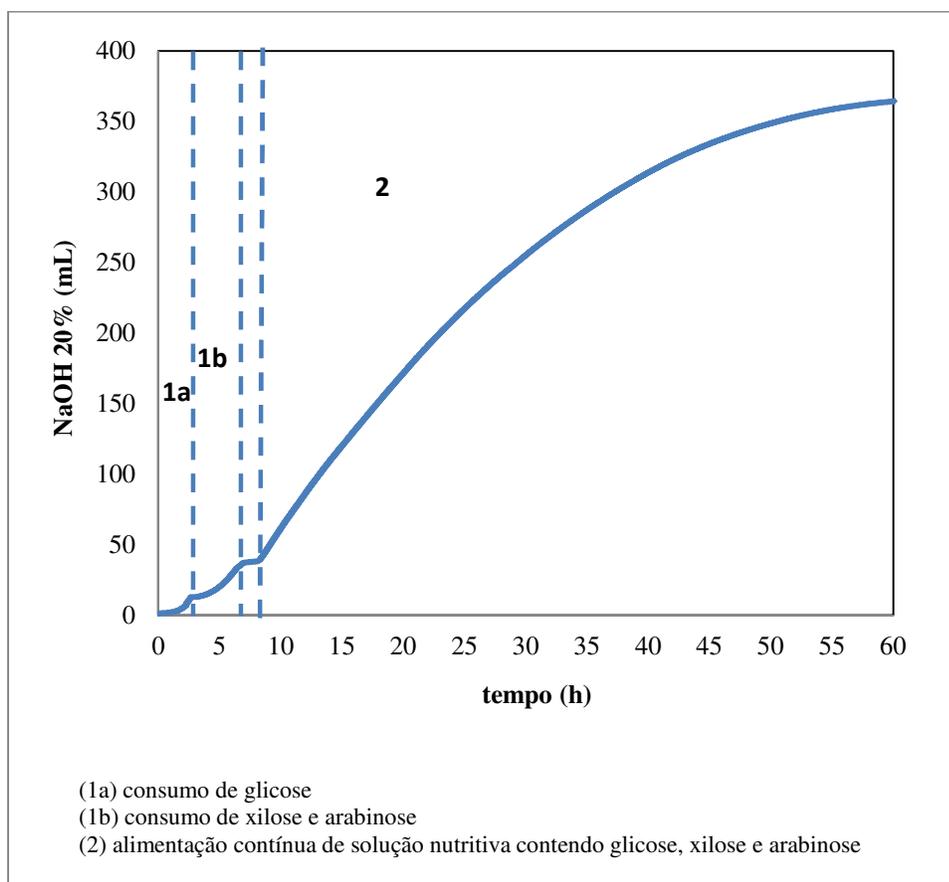
Se considerarmos diferentes velocidades específicas de consumo de hexose e pentoses podemos encontrar um  $\mu_{\text{global}}$ , que seria a média ponderada entre estas velocidades. Dividindo o

processo em dois estágios, o primeiro consistindo em uma batelada simples e o segundo consistindo na alimentação contínua do biorreator, podemos calcular os parâmetros cinéticos apresentados na **Tabela 9** abaixo:

**Tabela 9.** Parâmetros cinéticos da fermentação de *B. coagulans* 162 em meio sintético e batelada alimentada: 1ª etapa (batelada simples) e 2ª etapa (alimentação contínua).

<i>Estágio</i>	$\mu_x$ ( <i>global</i> )	$Y_{p/s}$	$Q_p$
1ª etapa (batelada)	3,11 h <sup>-1</sup>	0,96	3,02 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
2ª etapa (alimentação contínua)	4,02 h <sup>-1</sup>	0,52	1,43 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Acumulado	3,27 h <sup>-1</sup>	0,54	1,52 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

As duas etapas que ocorreram durante a fermentação podem ser visualizadas na **Figura 20**.



**Figura 20.** Consumo de NaOH 20% durante fermentação de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo sintético em regime de batelada seguido de alimentação contínua. As fases 1a e 1b correspondem à 1ª etapa (ou batelada). A fase 2 corresponde à 2ª etapa (alimentação contínua).

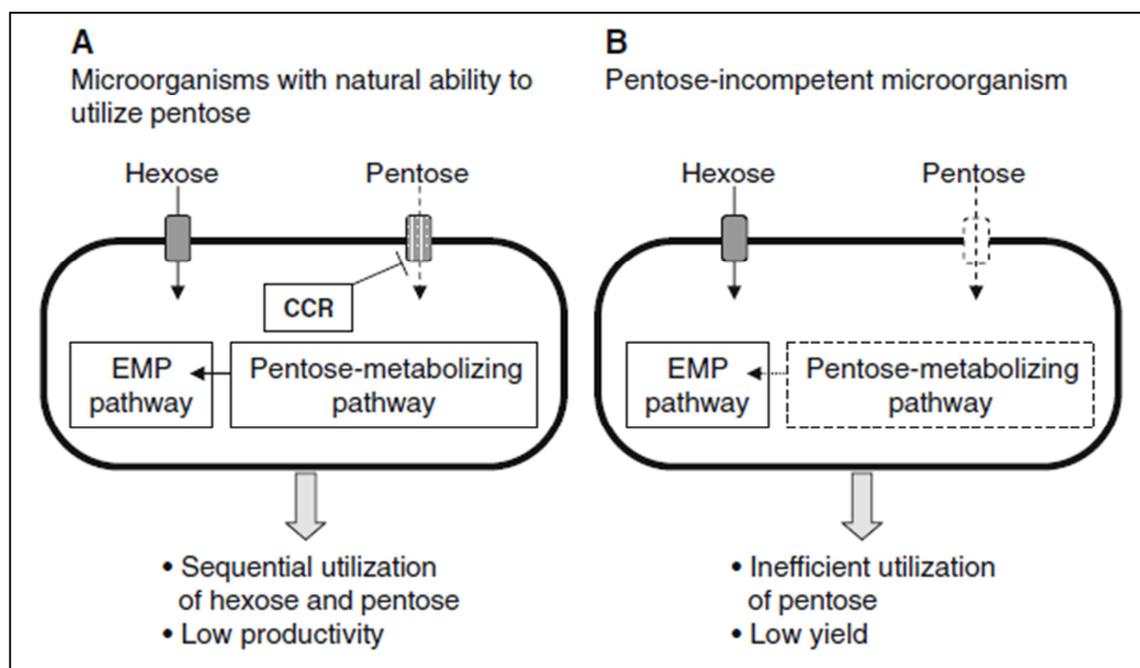
Foi verificado experimentalmente que a bactéria *B. coagulans* 162 utiliza preferencialmente a glicose em sua via catabólica, apesar de ter sido adaptada em meio contendo pentoses como fonte de carbono. Este crescimento diáuxico (**Figura 20**) pode ser bem visualizado na etapa de batelada e pode ser dividido em duas fases: (**1a**) consumo de glicose e (**1b**) consumo de pentoses.

A etapa **1a** caracteriza-se pelo consumo exclusivo da glicose com formação de ácido láctico homofermentativamente. Nesta fase, que durou aproximadamente 2,2 h, há formação de ácido láctico, mas de nenhum ácido acético, e nenhum consumo de xilose ou arabinose foi detectado. O número de microrganismos viáveis parece ter aumentado, contudo nenhum crescimento significativo da biomassa foi observado. Ao final desta etapa, a produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) do *B. coagulans* 162 foi igual a  $0,505 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  com rendimento ( $Y_{p/s}$ ) igual a 0,98.

Na etapa **1b**, que durou aproximadamente 4,5 h, toda a glicose já havia se exaurido do meio e o microrganismo iniciou o consumo das pentoses xilose e arabinose. Neste momento, há continuidade da produção do ácido láctico, mas também de ácido acético em baixa concentração. Ao final desta fase, não havia mais qualquer traço de açúcares e houve um aumento significativo do número de células microbianas (maior que  $4 \times 10^9$  células/mL) bem como de biomassa (maior que  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de meio fermentado). A produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) obtida foi igual a  $1,081 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e o rendimento igual a 0,796. O rendimento  $Y_{p/s}$  máximo se deu a 8,6 h do início do processo fermentativo e foi igual a 0,96. Neste mesmo momento, a produtividade volumétrica era igual a  $1,090 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , entrando em declínio a partir de então.

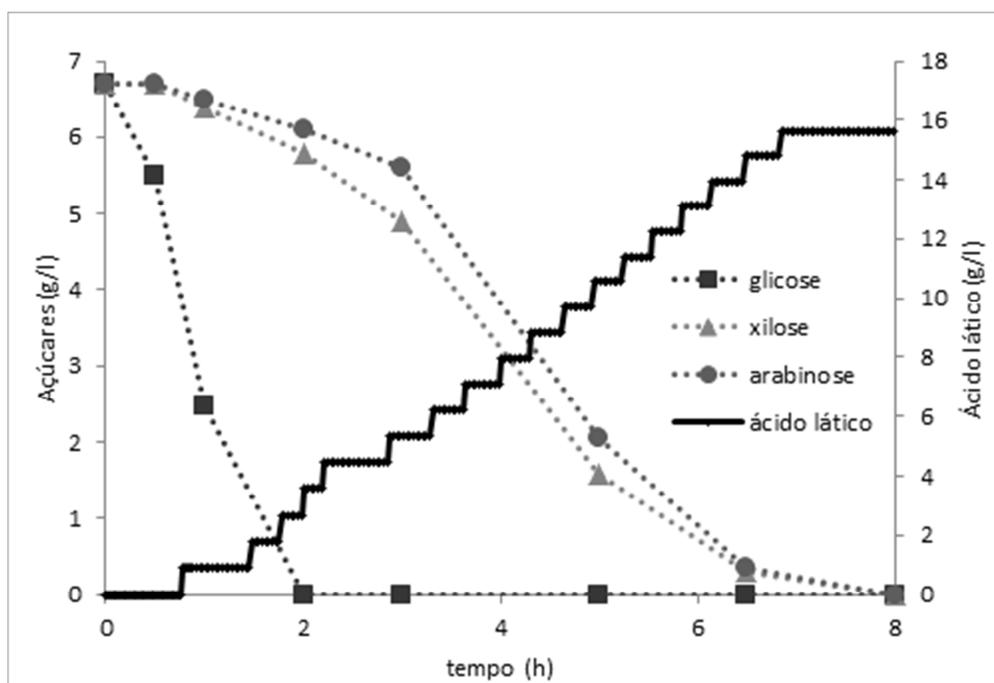
De acordo com JOJIMA *et al.* (2010) a glicose é, não apenas principal unidade estrutural da celulose, mas também substrato de fermentação para a maioria dos microrganismos, incluindo os principais microrganismos industriais *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em contraste, as pentoses xilose e arabinose que são os principais componentes da hemicelulose são geralmente muito menos susceptíveis à ação bacteriana. Apenas alguns poucos microrganismos como *E. coli* e *B. subtilis* possuem a capacidade natural para utilizá-las. Independentemente dessa habilidade natural dos microrganismos para metabolizar pentoses, a produtividade e o rendimento destes açúcares são, invariavelmente baixos, mesmo quando os genes de suas enzimas catabolizantes são expressos e são totalmente funcionais. Isto tem sido atribuído a uma variedade de fenômenos incluindo repressão catabólica (DEUTSCHER, 2008), desequilíbrio redox celular no metabolismo das pentoses e absorção ineficiente de alguns açúcares (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007; JEFFRIES & JIN, 2004). A importância de cada um

destes fenômenos varia com o microrganismo. A **Figura 21** ilustra o processo *uptake* dos açúcares em dois diferentes microrganismos: aquele com capacidade de utilizar pentoses em suas vias metabólicas e o outro incapaz.



**Figura 21.** Desafios técnicos para desenvolvimento de biocatalisadores para produção de compostos químicos de alto valor agregado e combustíveis a partir de hidrolisados lignocelulósicos. Microrganismos do grupo A incluem *E. coli* e alguns *Bacillus*. Devido à repressão catabólica (CCR), a utilização das pentoses se inicia apenas quando as hexoses se esgotam do meio. Microrganismos do grupo B possuem deficiência no uptake de pentoses e/ou na produção de enzimas. Fonte: JOJIMA *et al.* (2010).

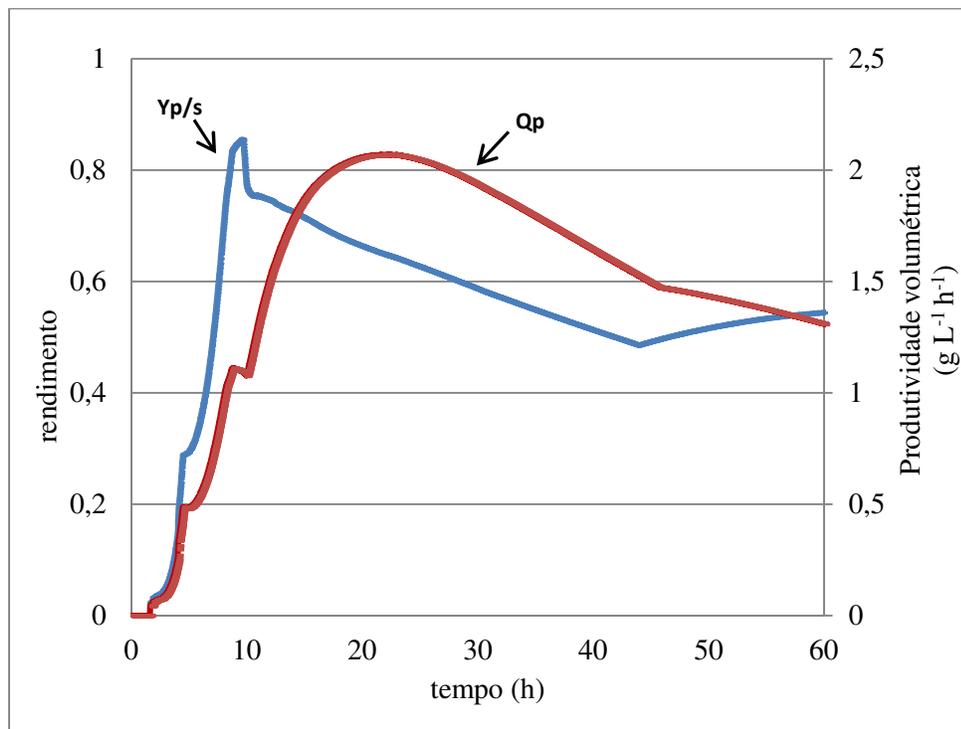
As gráficos da **Figura 22** ilustram a 1ª etapa em maior escala e mostram o consumo de açúcares e produção de ácido láctico. Na etapa de batelada pode-se observar que o consumo das pentoses se inicia após depleção da glicose. Durante as fases log e estacionária de crescimento microbiano foi possível observar a produção de ácido láctico. O fim da batelada, foi evidenciada pela estabilização do pH e não necessidade de adição de NaOH 20% ao meio com o objetivo de neutralizar os ácido formados.



**Figura 22.** Reprodução em maior escala da 1ª etapa (regime de batelada) durante cinética de produção de ácido láctico e consumo de açúcares por *B. coagulans* 162.

A alimentação (etapa 2) se iniciou com o bombeamento de solução concentrada de açúcar (glicose  $133 \text{ g L}^{-1}$ , xilose  $133 \text{ g L}^{-1}$  e arabinose  $133 \text{ g L}^{-1}$ ) num fluxo constante de  $20,4 \text{ mL h}^{-1}$ . A princípio, os três açúcares foram consumidos continuamente até que a produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) começou a diminuir após  $21,6 \text{ h}$  atingindo o máximo igual a  $2,069 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ( $22,97 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Neste ponto, o rendimento  $Y_{p/s}$  foi igual a  $0,644$ . Nesta fase não houve crescimento microbiano, o número de células se manteve constante (aproximadamente  $5 \times 10^9$  células por mL) e a biomassa atingiu seu valor máximo de  $6,33 \text{ g mL}^{-1}$  de meio fermentado. A partir de então, a concentração dos açúcares no meio começou a aumentar. O primeiro açúcar detectado foi a arabinose, após  $36 \text{ h}$ , seguido pela xilose, após  $38 \text{ h}$ . Atingido a taxa de conversão máxima, e com os três substratos, glicose, xilose e arabinose, em excesso no meio, tem-se a evidência de que o microrganismo possui preferência por catabolizar a glicose, o que provavelmente ocorre pela via EMP, que é a via de onde ele obtém maior ganho energético.

Os coeficientes produtividade volumétrica e rendimento podem ser visualizados ponto a ponto no gráfico da **Figura 23**.



**Figura 23.** Produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) e rendimento ( $Y_{p/s}$ ) durante fermentação de *B. coagulans* 162 (150 rpm/52°C/pH 6) para produção de ácido lático em biorreator e meio sintético contendo glicose, xilose e arabinose como fontes primárias de carbono em regime de alimentação semi contínua.

Por muito tempo a produção do L(+)-ácido lático tem sido testada fermentativamente; utilizando desde diferentes fonte de açúcares e microrganismos até diferentes regimes de processo, sempre visando otimizar a produção do ácido lático no sentido de diminuir o custo produtivo e melhorar o rendimento.

Pela via das pentoses, os açúcares L-xilose e L/D-arabinose são isomerizados para suas respectivas pentuloses que são subsequente fosforiladas. A enzima D-xiluloquinase catalisa a fosforilação de D-xilulose para D-xilulose-5-fosfato. Depois de xilulose-5-P, têm-se duas vias anaeróbicas possíveis: (1) Clivagem das pentoses com formação de 3C+2C pela fosfoquetolase ou (2) formação de hexose-P, composto de 6C pela via das pentoses-fosfato que entra na via glicolítica (transaldolase e transquetolase). Em bactérias ácido-láticas, as pentoses são metabolizadas pela via fosfoquetolase. Nesta via, o intermediário D-xilulose-5-fosfato é clivado em gliceraldeído-3-fosfato e acetil fosfato que conduzem à produção de ácido lático, ácido acético e/ou etanol. Entretanto de alguns estudos sugerem, para alguns microrganismos, a existência de uma via metabólica onde toda a pentose seria convertida em ácido lático (TANAKA *et al.*, 2002) levando à obtenção de um coeficiente de rendimento teórico em lactato a partir de pentoses

próximo a 1,0 mol/mol. O segundo caso considerado (PPP) seria o mais interessante do ponto de vista econômico uma vez que todo o açúcar utilizado é convertido em ácido láctico.

Muitos trabalhos têm descrito a utilização de meios complexos, compostos por mais de um substrato, para a produção de compostos químicos. PATEL *et al.* (2005) descreveram a utilização de glicose e xilose derivados do hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar num sistema de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) para a produção de ácido láctico com pureza de 95% por *Bacillus* sp. No trabalho foi obtida produtividade volumétrica máxima de 6,7 mmol L<sup>-1</sup> (h) após 144 h. Em trabalho posterior, PATEL *et al.* (2006) verificaram que a xilose havia sido metabolizada pelo via das pentose-fosfato por uma linhagem isolada de *Bacillus coagulans*. Segundo os autores, uma das vantagens em se usar estas linhagens em sistemas do tipo SSF é que o pH e temperatura ótimos para sacarificação são similares àqueles requeridos para fermentação.

Outro fator importante a se considerar para otimizar a produtividade fermentativa é o regime a ser empregado. Quando se trata de materiais lignocelulósico, existem duas opções principais de condução do processo fermentativo: em duas etapas separadas com sacarificação do material e posterior fermentação (SF) e onde a sacarificação ocorre simultaneamente à fermentação (SSF). Em relação à fermentação láctica, o processo SSF é vislumbrado com objetivo de reduzir o custo do processo pela economia de tempo e enzimas utilizadas, entretanto este processo é limitado pelas celulasas fúngicas não possuírem suas condições ótimas de atividade, pH 5,0 e temperatura de 50°C, próximas àquelas de crescimento da bactéria acidoláctica, que em geral se situa em torno de pH 6,0 (PATEL *et al.* 2006) e temperatura entre 30 e 52°C. Isto onera o custo pela necessidade de se aumentar a atividade enzimática utilizada. Além disso, as bactérias lácticas não são organismos potenciais fermentadores de pentoses como xilose e arabinose na conversão em ácido láctico. Entretanto vários autores têm descrito o isolamento de linhagens com condições ótimas de crescimento próximas àquelas requeridas para atividade das enzimas hemicelulolíticas para produção de ácido láctico. PATEL *et al.* (2005) relataram o isolamento de uma linhagem, denominada *Bacillus* sp. 36D1 capaz de converter glicose e xilose derivadas do bagaço da cana de açúcar em regime de co-fermentação e sacarificação simultânea (SSCF) e glicose derivada de celulose cristalina em SSF, produzindo aproximadamente 45 g L<sup>-1</sup> de L(+)-lactato em ambos os casos. Posteriormente, PATEL *et al.* (2006) isolaram três linhagens identificadas como *Bacillus coagulans* capazes de utilizar a via das pentose-fosfato para fermentação de xilose.

As temperaturas da hidrólise enzimática (50°C) e de fermentação ótimas do *B. coagulans* (52°C) são próximas viabilizando uma SSF. Entretanto, o pH ótimo de atividade das enzimas hemicelulolíticas (pH 4,8) é um pouco abaixo daquela para crescimento do microrganismo (pH 6,0).

A possibilidade de estudar o modelo cinético sem a presença de inibidores naturalmente presentes em hidrolisado hemicelulósicos permite entender como o microrganismo se comporta no consumo de açúcares em condições ideais. A partir daí resta-nos tentar obter o melhor resultado em meios reais.

No presente trabalho pode-se observar que a captura da xilose ocorre quando o nível de glicose está baixo. O microrganismo consome preferencialmente a glicose pela via fermentativa que permite maior ganho energético, a glicólise. O ácido láctico é produzido durante as fases primária e secundária no processo fermentativo.

#### 4.4. Conclusão

Neste estudo foi possível observar crescimento diáuxico, caracterizado pelo consumo preferencial da glicose, tendo o consumo da xilose e da arabinose indistintamente se iniciado quando a hexose se esgotou do meio.

Durante a primeira etapa, em batelada, a velocidade específica de produção de ácido láctico ( $\mu_p$ ) foi igual a  $3,11 \text{ h}^{-1}$ . A eficiência e a produtividade volumétrica obtidas foram  $0,96$  e  $3,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. A fermentação se iniciou com  $10^6$  células viáveis por mL, alcançando  $10^{10}$  células viáveis por mL ao fim da batelada e finalizando a etapa de alimentação contínua com  $10^{11}$  células viáveis por mL.

A taxa de alimentação da segunda etapa foi calculada levando-se em conta a velocidade média de consumo de açúcares totais durante a primeira etapa. Nesta etapa foi obtido velocidade específica de produção de ácido láctico igual a  $4,02 \text{ h}^{-1}$ . A eficiência e a produtividade volumétrica obtidas foram iguais a  $0,52$  e  $1,43 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

O alto rendimento em conversão de açúcares em ácido láctico deveu-se possivelmente ao uso da rota pentose-fosfato. Para cálculo do rendimento na conversão em ácido láctico, um estudo prévio que considerou o ácido láctico produzido exclusivamente a partir do extrato de levedura como fonte de carboidratos foi utilizado.

## 5. HIDRÓLISE TÉRMICA DO BAGAÇO DA CANA DE AÇÚCAR, CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL TRATADO E FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO

---

### 5.1. Resumo

O bagaço in natura apresentou aproximadamente 43% de celulose, 28% de hemicelulose e 14% de lignina. Durante processo de caracterização é realizada hidrólise com ácido sulfúrico, o que provoca uma despolimerização do polissacarídeo formando oligômeros e seus açúcares constituintes. Sabe-se que a composição da fibra da cana pode variar entre espécies, manejo, maturidade da planta e região.

Este trabalho visou estudar a hidrólise térmica do bagaço da cana de açúcar e fermentação do hidrolisado térmico seguido de hidrólise enzimática.

Os efeitos dos parâmetros tempo e temperatura sobre a hidrólise térmica foram investigados em relação à liberação de açúcares e formação de ácido acético. No hidrolisado obtido a 220°C por 5 minutos contendo aproximadamente 8% de bagaço (base seca) foi encontrado maior concentração de açúcares totais resumidos a xilose (2,15 g L<sup>-1</sup>) e glicose (1,23 g L<sup>-1</sup>). Foi encontrado ainda 2,87 g L<sup>-1</sup> de ácido acético.

Após hidrólise enzimática as frações constituintes do bagaço foram despolimerizadas. A partir da fração hemicelulósica obteve-se xilose, ácido acético e furfural. A partir da celulose, quantidades predominantes de glicose e o hidroximetilfurfural (HMF) foram liberados. Houve formação de ácido fórmico, que pode ser encontrado devido à conversão do HMF. O meio de cultivo utilizado na fermentação continha 51,37 g L<sup>-1</sup> de monossacarídeos totais (essencialmente glicose e xilose). Na fermentação foi obtido rendimento de 0,96 e produtividade volumétrica igual a 4,11 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> na produção de ácido láctico.

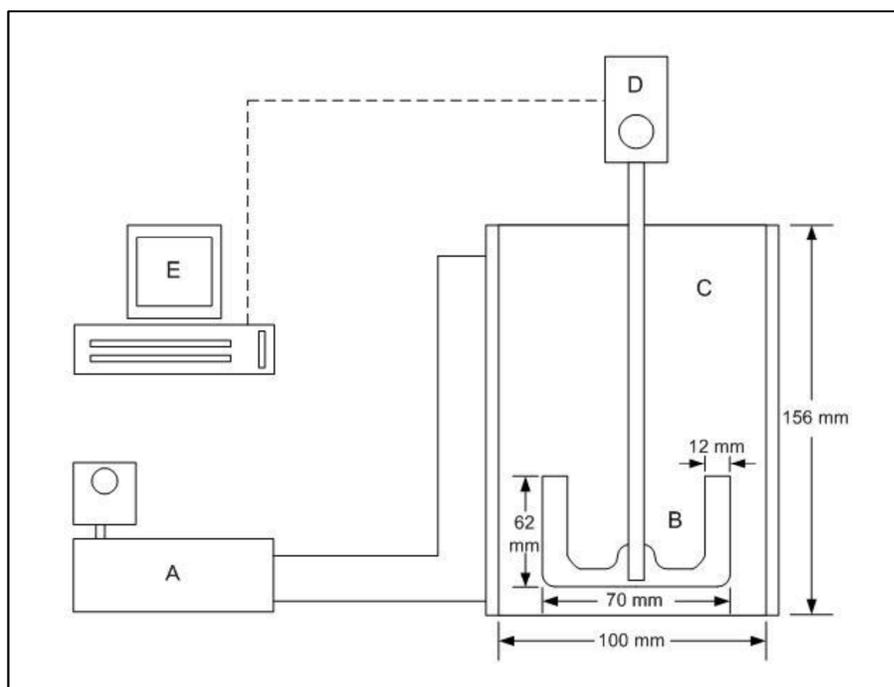
## **5.2. Materiais e métodos**

### **5.2.1. Obtenção do bagaço *in natura***

A cana de açúcar foi gentilmente cedida pelo Departamento de Fisiologia Vegetal do instituto Max Plank (Postdam, Alemanha). Plantas sadias da variedade NCO310 e Q117 (CHACRA, Argentina), crescidas em casa de vegetação tiveram as folhas e raízes descartadas. Os caules foram picados, moídos e prensados. O caldo de cana extraído, rico em sacarose, não foi considerado neste estudo, tendo sido descartado. A fração sólida, ou o bagaço, foi vigorosamente lavado com água destilada até que o teor de açúcares livres na água de lavagem fosse inferior a  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ . Ao final do processo o bagaço apresentou aproximadamente 50% de umidade e foi caracterizado quanto às frações celulose, hemicelulose, lignina (solúvel e insolúvel) e cinzas.

### **5.2.2. Hidrólise térmica**

A hidrólise térmica do bagaço consistiu em submeter o bagaço a alta pressão e diferentes combinações de tempo e temperatura. Foram testadas as temperaturas 180, 200 e 220°C e os tempos testados foram 5, 10 e 15 min. O procedimento foi realizado em reator equipado com agitador tipo axial (IKA, USA) e monitorado por software (**Figura 24**). Uma massa de 40 g de bagaço úmido (50% de umidade) foi colocada no reator com volume completado com água destilada para 260 mL. Os experimentos foram realizados em duplicata.



**Figura 24.** Equipamento utilizado para hidrólise hidrotérmica. A. Sistema controlador da temperatura; B. hélice; C. Reator; D. Motor do eixo axial; E. Sistema de armazenamento de dados.

Os hidrolisados e o bagaço residual foram testados em relação às frações remanescentes (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas) e compostos produzidos (glicose, xilose, arabinose e ácido acético).

O hidrolisado com maior rendimento em açúcares livres foi selecionado para ser hidrolisado enzimaticamente e utilizado na fermentação.

### 5.2.3. Hidrólise enzimática

O material hidrolisado obtido a 220°C/5 min seguido de hidrólise enzimática foi fermentado por *Bacillus coagulans* 162. As enzimas Celulase (15 FPU g<sup>-1</sup> de bagaço seco), Celobiase (60 CBU g<sup>-1</sup> de bagaço seco) e Xilanase (300 XU g<sup>-1</sup> de bagaço seco) da NOVOZYMES (Dinamarca) foram utilizadas para hidrolisar o residual de hemicelulose e celulose. No biorreator, ao material pré-tratado foram adicionados os extratos enzimáticos. A temperatura foi estabilizada em 50°C, em agitação de 50 rpm por 48 h. Ao final deste tempo, a mistura de reação se apresentou como uma solução homogênea, de cor marrom e fluida e foi filtrada em papel Whatman n°4. O hidrolisado foi esterilizado a 118°C por 15 min e conservado a -8°C.

O hidrolisado obtido após tratamento térmico e enzimático foi denominado Hidrolisado Hidrotérmico (HT), e foi utilizado como fonte de açúcares para a fermentação por *B. coagulans* 162 para produção de ácido lático.

#### **5.2.4. Determinação analítica das frações de celulose, hemicelulose e lignina**

As principais frações constituintes do bagaço foram obtidas de acordo com a metodologia proposta por VAN SOEST & WINE (1967) utilizando equipamento ANKOM<sup>220</sup>, (Ankom Technology Corp.). Esta metodologia é baseada na sucessiva lavagem do material lignocelulósico com detergentes e eliminação gradual das frações de lignina, hemicelulose e celulose. Os resultados das frações são obtidos mediante gravimetria.

##### **5.2.4.1 Preparo das amostras**

As amostras foram inicialmente liofilizadas para minimizar o risco de crescimento microbiano durante secagem. Todas as massas foram medidas com aproximação de 0,1 g. O material foi colocado em container e preenchido até menos da metade. O container e a biomassa foram pesados. O material foi seco até que todos os visíveis traços de gelo se extinguissem, o qual durou 96 h. Após equilíbrio com a temperatura ambiente o container e a biomassa foram pesados. A biomassa seca foi moída usando moinho de facas para reduzir o tamanho das partículas a 1 mm (20 mesh).

O passo seguinte foi a separação das frações solúvel e insolúvel por filtração. Nesta etapa todas as massas foram pesadas com pesadas com aproximação de 0,01 g em balança analítica. Amostras de 10 g foram adicionadas a 20 mL de água deionizada e a mistura foi homogeneizada. O peso de um funil de Büchner com filtro de papel foi obtido. Todas as análises foram feitas em duplicatas. A amostra foi filtrada a vácuo por 5 minutos. Ainda sob vácuo, as amostras receberam a adição de 20 mL de água deionizada. As amostras foram agitadas e filtradas. Este processo foi repetido até que 100 mL de água deionizada fossem adicionados à biomassa (ou menos de 0,05 g L<sup>-1</sup> de glicose remanescente). A fração líquida foi reservada e refrigerada para posterior análise. As amostras lavadas, o funil e o papel de filtro foram secos e pesados juntos.

A fração sólida ou fração insolúvel foi utilizada para determinação de celulose, hemicelulose e lignina.

#### 5.2.4.2. Análise da fração insolúvel

A determinação da celulose, da hemicelulose e da lignina, principais componentes da fração insolúvel foi realizada em procedimento baseado na extração sucessiva com detergentes. O procedimento foi realizado utilizando-se saquinhos de papel de filtro contendo as amostras desidratadas, em processo “*in-house*” por meio do equipamento analisador de fibras ANKOM<sup>220</sup> (Ankom Technology Corp., USA).

##### 5.2.4.2.1. NDF

Determinação da fração NDF ou “Neutral Detergent Fiber” é um procedimento usado para quantificação fração celulose, hemicelulose e lignina. NDF é definido como o procedimento que permite a obtenção de resíduo após tratamento com solução ácida de detergente (Lauril sulfato de sódio e EDTA). Uma solução detergente neutra é usada (30 g de Lauril sulfato de sódio; 18,61 g de EDTA sal disódico dihidratado; 6,81 g de tetraborato sódico decahidratado; 4,56 g de fosfato de sódio dibásico anidro; 10 mL de trietileno glicol em 1 L de água destilada. O pH se situou entre 6,9 e 7,1). Neste procedimento foram usados solução de detergente neutra, alfa amilase bacteriana termoestável (17 400 Liquefon Units mL<sup>-1</sup>) e sulfito de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>).

Dois litros de detergente neutro foram colocados na câmara de extração. Os saquinhos de filtro (F57, 25 µm, Ankom Technology Corp.) contendo 0,5 g da amostra teste foram colocadas nas bandejas plásticas que foram inseridas na câmara. A câmara foi tampada e a solução aquecida a 100°C em 15 minutos. Após 60 minutos de extração (75 min total) o detergente foi expelido. Os saquinhos de filtro foram lavados quatro vezes com 2 L de água a 80-90°C contida na câmara. Cada lavagem foi realizada por 5 minutos com a tampa da câmara tampada, aquecida e agitada. Após a última lavagem, os saquinhos de filtro contendo a amostra foram removidos da câmara, colocados entre papéis absorventes e suavemente pressionados para remoção de água.

Os saquinhos de filtro foram então colocados em jarra (500 mL) onde 250 mL de acetona foram adicionados. A jarra foi fechada e agitada três vezes durante 5min. Após cada extração, o volume de acetona (250 mL) foi trocado. Ao fim das extrações, os saquinhos foram submetidos a secagem em estufa com fluxo de ar a 105°C por pelo menos 8 horas antes de ser pesado. Além disso, 5 mL de α-amilase termoestável foram adicionados nas duas primeiras etapas de lavagem. Para o método NDF, 20 g de sulfato de sódio e 5 mL de α-amilase termoestável foram misturados com solução ND antes de ser adicionado à câmara de extração.

#### 5.2.4.2.2. ADF

Determinação da fração ADF ou “Acid Detergent Fibre” é um procedimento utilizado para determinação das frações de celulose e lignina em fibras vegetais. A Fibra de Detergente Ácido é definida como o resíduo obtido após tratamento com solução detergente ácida (20 g brometo de cetil trimetilamônia para 1 litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N previamente padronizada). Dois litros da solução detergente ácida foram colocados dentro da câmara de extração. O processo de extração foi exatamente como o descrito anteriormente para NDF, utilizando-se os saquinhos de filtro contendo as amostras secas obtidas nesta etapa, sem, contudo utilizar a  $\alpha$ -amilase termoestável.

#### 5.2.4.2.3. ADL

Determinação da fração ADL ou “Acid Detergent Lignin” é um procedimento que permite determinar a quantidade de lignina (solúvel e insolúvel) presente no material lignocelulósico. A lignina detergente ácido é definida como o resíduo obtido após tratamento inicial pelo método ADF, seguido de remoção da fração celulósica usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%. Foram utilizadas solução detergente ácida (20 g de brometo de cetil trimetilamônia para 1 litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N previamente padronizado) e solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%. Dois litros do detergente ácido foram colocados na câmara de extração. O procedimento de lavagem com água aquecida é exatamente igual ao citado anteriormente. Depois de lavados, os saquinhos de filtro foram submetidos ao contato com a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aquecido e lavados novamente com 2 L de água a 80-90°C. Após secos, os saquinhos foram colocados em jarras (500 mL) com 250 mL de acetona e o procedimento de extração se realizou como descrito anteriormente.

#### 5.2.4.2.4. Cálculos

Os teores de hemicelulose, celulose e lignina foram obtidos de acordo com os seguintes cálculos:

$$\% \text{ NDF} = [W_3 - (W_1 * C_1)] * 100 / W_2 \quad (\text{eq. 1})$$

$$\% \text{ ADF} = [Y_3 - (Y_1 * C_2)] * 100 / Y_2 \quad (\text{eq. 2})$$

$$\% \text{ ADL} = [Z_3 - (Z_1 * C_3)] * 100 / Z_2 \quad (\text{eq. 3})$$

$$\text{NDF} - \text{ADF} = \text{teor de hemicelulose} \quad (\text{eq. 4})$$

$$\text{ADF} - \text{ADL} = \text{teor de celulose} \quad (\text{eq. 5})$$

$$\text{ADL} = \text{teor de lignina} \quad (\text{eq. 6})$$

Onde:

$W_1$  = peso da tara do saco no método NDF

$W_2$  = peso da amostra no método NDF

$W_3$  = peso seco do saco com amostra após processo de extração no método NDF

$C_1$  = saco de correção “*blank*” (peso seco final dividido pelo peso do saco “*blank*” original) no método NDF

$Y_1$  = peso da tara do saco no método ADF

$Y_2$  = peso da amostra no método ADF

$Y_3$  = peso seco do saco com amostra após processo de extração pelo método ADF

$C_2$  = saco de correção “*blank*” (peso seco final dividido pelo peso do saco “*blank*” original) no método ADF

$Z_1$  = peso da tara do saco no método ADL

$Z_2$  = peso da amostra no método ADL

$Z_3$  = peso seco do saco com amostra após processo de extração no método ADL

$C_3$  = saco de correção “*blank*” (peso seco final dividido pelo peso do saco “*blank*” original) no método ADL

## **5.2.5. Fermentação do hidrolisado**

### **5.2.5.1. Microrganismo**

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Bacillus coagulans* 162, obtida da coleção de microrganismos do ATB – Leibnitz Institut for Agricultural Engineering (Potsdam, Alemanha) e conservada de acordo com o descrito no item 3,2,3,2,

### **5.2.5.2. Meio de cultivo**

O meio de cultivo, composto por extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>); sulfato de magnésio (0,1 g L<sup>-1</sup>); sulfato de manganês (0,05 g L<sup>-1</sup>) e hidrolisado HH foi esterilizado em autoclave a 121°C/30min. O hidrolisado HH foi esterilizado separadamente para evitar reações de escurecimento não enzimáticas. O meio de cultivo contendo

hidrolisado do bagaço da cana de açúcar obtido por hidrólise térmica seguida de hidrólise enzimática foi denominado MRS<sub>HH</sub>.

#### **5.2.5.3. Inóculo**

Uma alçada de células jovens (24 h) foi inoculada em 80 mL de meio de cultivo MRS modificado acima descrito, contido em frasco Erlenmeyer (250 mL). O frasco foi submetido a 52°C a 150 rpm por 24 h.

#### **5.2.5.4. Fermentação**

A fermentação foi realizada em biorreator Newbrunswick (USA), com capacidade de 3,5 L de volume de trabalho. Inicialmente, o inóculo (80 mL) foi adicionado a 720 mL de meio estéril contido no biorreator. O pH 6,0 foi mantido constante pela adição de solução de NaOH 20%. O sistema foi submetido à agitação de 150 rpm e temperatura de 52°C.

Amostras foram retiradas a cada 2 h para obtenção da cinética de crescimento microbiano, determinação de ácido lático, ácido acético, ácido fórmico, glicose, xilose e arabinose.

#### **5.2.5.5. Procedimentos analíticos**

Amostra do meio fermentado foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore), convenientemente diluído e levado para análise em cromatógrafo. Meio não filtrado foi utilizado para contagem celular. Amostras retiradas ao longo de todo o processo foram analisadas conforme descrito no item 3.2.3.3.

##### **5.2.5.5.1, Determinação de açúcares**

Glicose, xilose e arabinose foram determinadas de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.1.

##### **5.2.5.5.2. Determinação de ácidos**

Ácidos lático e acético foram determinados de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.2.

##### **5.2.5.5.3. Determinação de células totais e viáveis**

Células totais e viáveis foram determinadas de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.3.

### 5.3. Resultados e discussão

#### 5.3.1. Hidrólise térmica

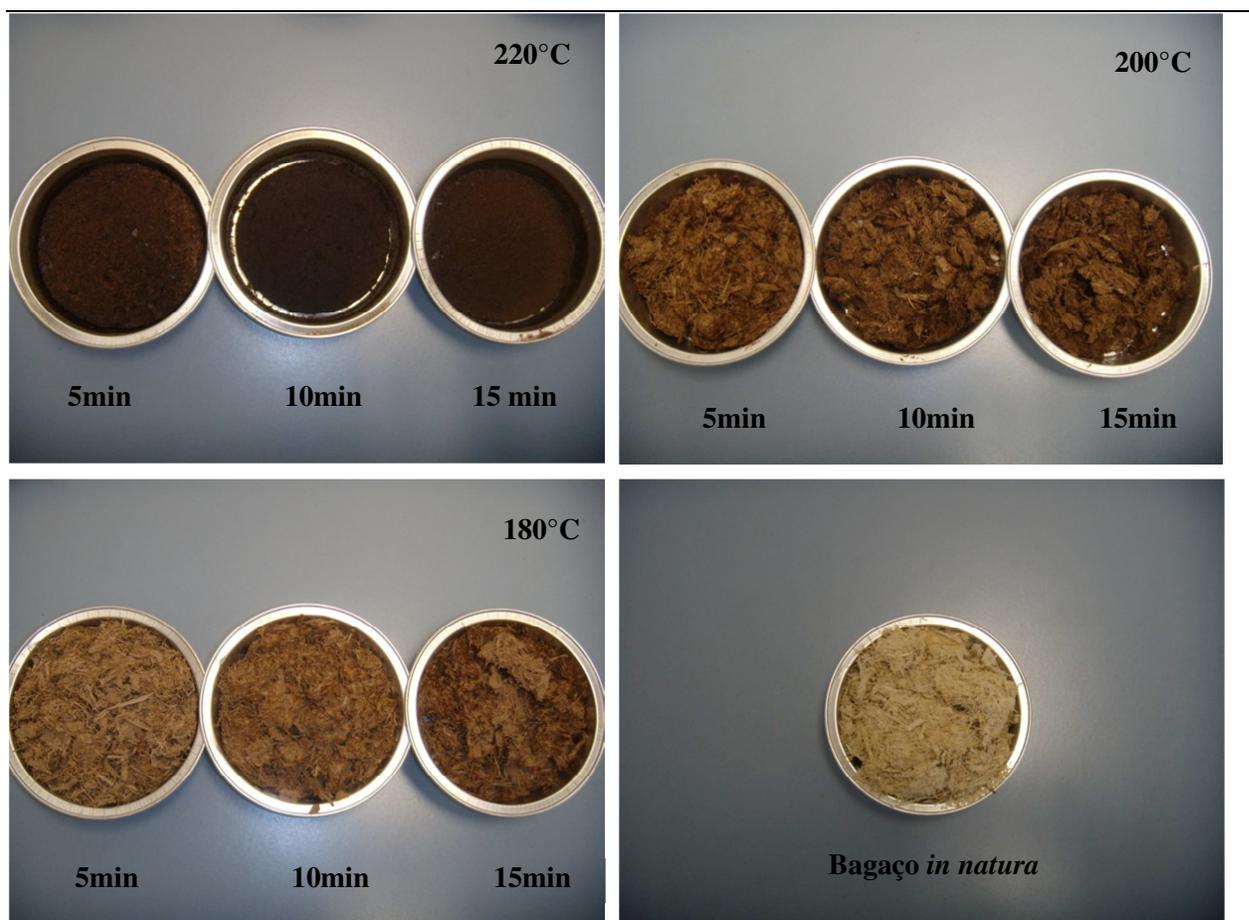
A mistura bagaço *in natura* e água (aproximadamente 8% de bagaço em base seca) contida no reator antes do tratamento térmico apresentou pH igual a  $7,02 \pm 0,03$ . Os parâmetros rotação, pressão e pH da mistura dentro do reator obtidos durante tratamentos hidrotérmicos podem ser resumidos de acordo com a **Tabela 10**, abaixo:

**Tabela 10.** Resumo dos parâmetros medidos durante hidrólise hidrotérmica do bagaço de cana de açúcar

	180°C	200°C	220°C
5 min	320 rpm 10,2 bar pH 3,78 (12°C)	336 rpm 15,6 bar pH 3,38 (11,8°C)	345 rpm 24,2 bar pH 3,00 (11,5°C)
10 min	330 rpm 9,8 bar pH 3,52 (11,7°C)	342 rpm 16,0 bar pH 3,08 (11,6°C)	334 rpm 24,2 bar pH 2,89 (10,8°C)
15 min	337 rpm 9,7 bar pH 3,47 (10,9°C)	352 rpm 16,1 bar pH 3,09 (11°C)	355 rpm 23,6 bar pH 2,95 (10,6°C)

Pode-se observar que a velocidade de rotação da hélice aumentou devido à diminuição do torque dentro do reator, o que ocorreu como consequência à diminuição da viscosidade da mistura de bagaço e água durante tratamento térmico. A pressão aumentou como resposta ao aumento da temperatura. O pH diminuiu provavelmente devido a liberação de compostos químicos como o ácido acético, por exemplo.

A fração residual sólida diminuiu sensivelmente com o aumento do tempo e da temperatura. A **Figura 25** mostra os resíduos sólidos secos do bagaço após tratamento térmico.



**Figura 25.** Frações sólidas residuais após tratamento hidrotérmico. Material utilizado para análise de celulose, hemicelulose, lignina insolúvel e cinzas.

A fração líquida obtida após filtração do material tratado apresentou coloração amarela, típica de hidrolisado rico em compostos coloridos como lignina e furfural (**Figura 26**).



**Figura 26.** Filtrados após tratamento térmico em diferentes temperaturas (220, 200 e 180°C) e tempos (5, 10 e 15 min). Material utilizado para análise de açúcares (glicose e xilose), lignina solúvel e ácido acético.

O resultado das frações de celulose, hemicelulose e lignina (**Tabela 11**) apresentaram-se um pouco acima daquelas obtidas na literatura. Paralelamente, baixo teor de cinzas foi obtido. Isto pode ser explicado devido ao fato de o bagaço utilizado ter sido obtido em laboratório, não seguindo processo de manuseamento usual da indústria. O bagaço não sofreu contato com solo ou cinzas oriundas das queimadas nos campos.

**Tabela 11.** Componentes remanescentes em 20 g de bagaço da cana de açúcar *in natura* (base seca) após tratamento hidrotérmico.

<b>tratamento</b>	<b>celulose</b>	<b>hemicelulose</b>	<b>lignina</b>	<b>cinzas</b>
Bagaço <i>in natura</i>	42,93 ± 3%	27,76 ± 1%	13,49 ± 1%	5 ± 0,3%
180°C/5min	40,44 ± 2,5%	12,54 ± 2%	13,06 ± 0,9%	5 ± 0,2%
180°C/10min	37,69 ± 3%	7,38 ± 3%	12,84 ± 0,8%	4 ± 0,4%
180°C/15min	40,19 ± 1,5%	5,72 ± 1,5%	12,18 ± 1,2%	6 ± 0,3%
200°C/5min	41,18 ± 1,2%	3,62 ± 0,8%	14,00 ± 0,5%	5 ± 0,4%
200°C/10min	40,72 ± 0,9%	1,04 ± 1,2%	13,85 ± 0,7%	4 ± 0,5%
200°C/15min	35,32 ± 1,3%	1,38 ± 1,1%	11,76 ± 0,8%	6 ± 0,3%
220°C/5min	35,95 ± 1,1%	1,84 ± 1%	5,46 ± 1%	5 ± 0,2%
220°C/10min	30,70 ± 1,2%	0	5,19 ± 0,8%	5 ± 0,3%
220°C/15min	26,39 ± 0,9%	0	3,28 ± 1,2%	4 ± 0,5%

Observa-se que a fração de hemicelulose foi a mais afetada pelo tratamento hidrotérmico. Para completa hidrólise do material, enzimas celulósicas foram necessárias. A celulose foi reduzida 39% quando tratado a 220°C/15min.

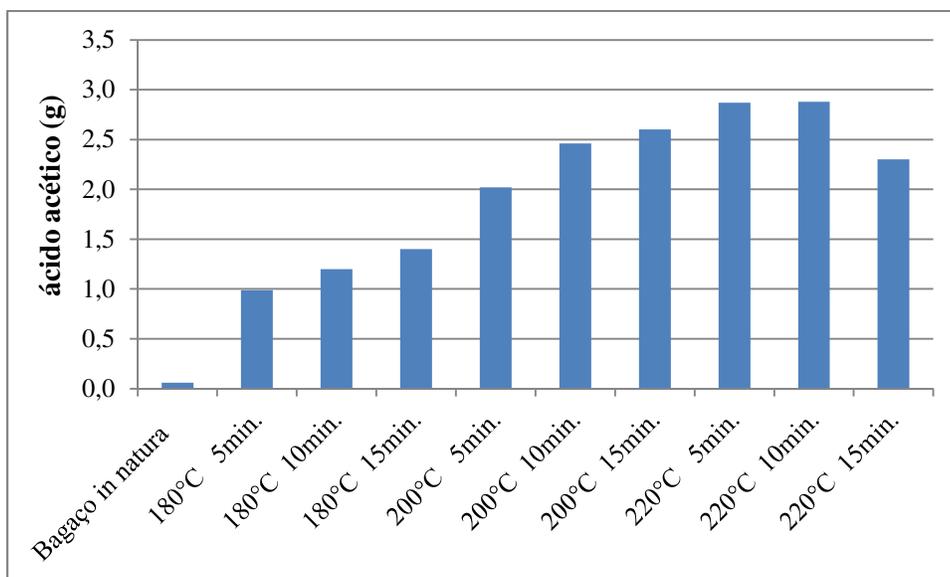
O baixo teor em cinzas não corresponde àquele normalmente encontrado pelas indústrias sucroalcooleiras devido ao fato de termos utilizado material colhido em laboratório e não submetido ao tratamento de corte e moagem usuais nas indústrias, onde há maior contato com o solo. O teor de cinzas se manteve constante.

Na **Tabela 12** pode-se verificar a concentração dos açúcares xilose e glicose e do ácido acético na fração líquida do material hidrolisado. A glicose parece ser a mais afetada pelo aumento da temperatura e tempo de exposição, há liberação deste açúcar mas provavelmente há também conversão deste a inibidores por reações de escurecimento não enzimático.

**Tabela 12.** Concentração de açúcares e ácido acético encontrados na fração líquida dos hidrolisados hidrotérmicos obtidos sob diferentes condições de tempo e temperatura. O teor de bagaço (em base seca) foi equivalente a 8%.

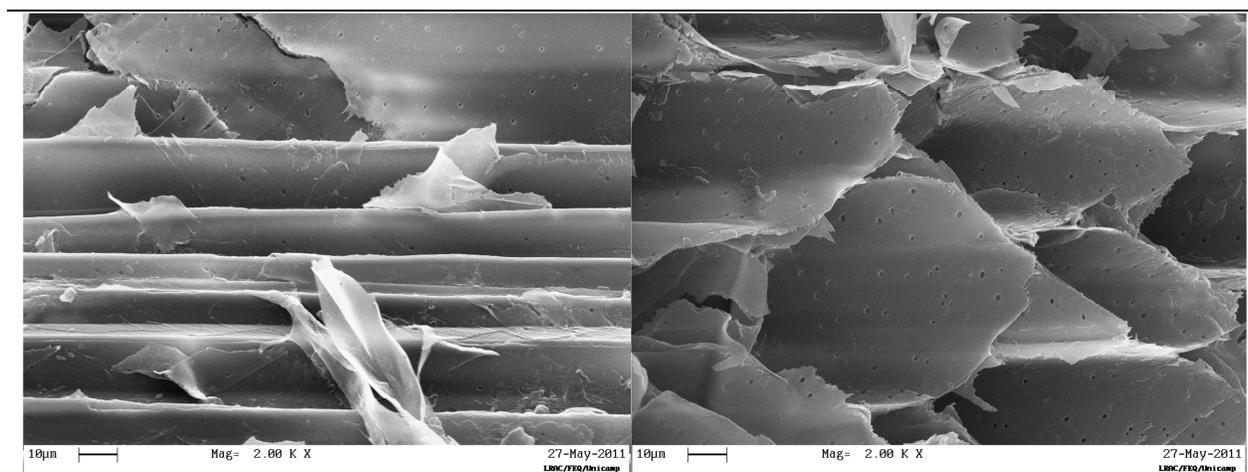
<b>Tratamento</b>	<b>xilose (g/L)</b>	<b>glicose (g/L)</b>	<b>ácido acético (g/L)</b>
180°C/5min	0,50	0	0,99
180°C/10min	1,50	0	1,20
180°C/15min	1,79	0,92	1,17
200°C/5min	1,89	0,60	2,02
200°C/10min	2,00	1,20	2,46
200°C/15min	2,05	1,10	2,00
<b>220°C/5min</b>	<b>2,15</b>	<b>1,23</b>	<b>2,87</b>
220°C/10min	2,10	1,22	2,88
220°C/15min	2,00	1,04	2,30

Na **Figura 27** pode-se observar que a formação de ácido acético aumenta com o aumento da temperatura e do tempo, entretanto, diminui ao a 220°C/15 min. Este fato pode ter ocorrido devido à perda por volatilização ou conversão de ácido acético a outro composto não avaliado neste estudo.



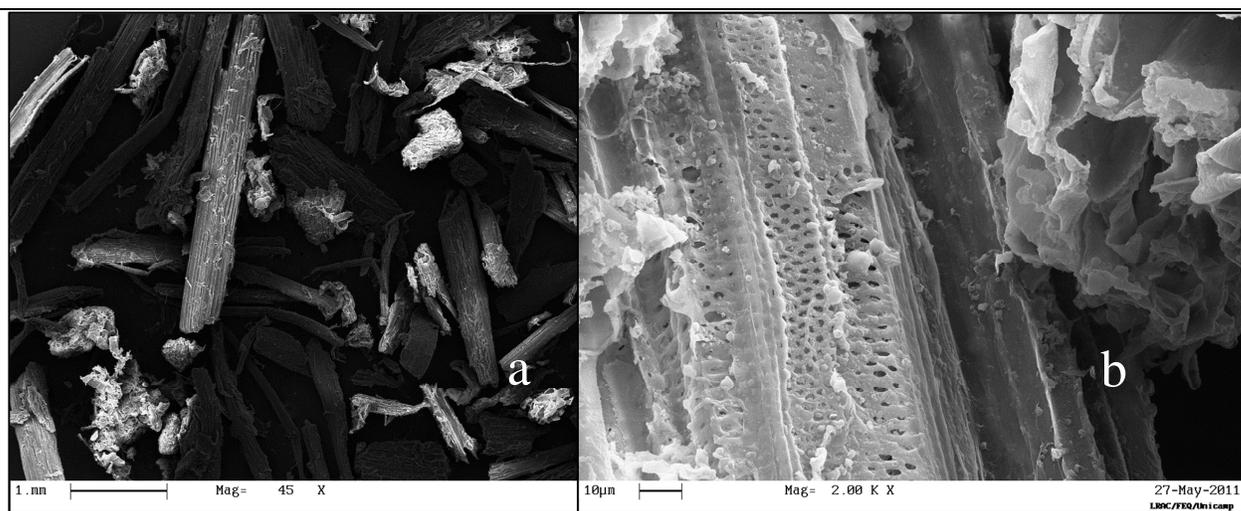
**Figura 27.** Valores de ácido acético obtidos de 100 g de bagaço da cana de açúcar (base seca) durante tratamentos térmicos.

Nas fotografias eletrônicas de varredura é possível ver em detalhes características do material *in natura* e tratado. Na **Figura 28**, o bagaço *in natura* se apresenta em estrutura organizada em fibras, constituídas por longos canais. Ao longo das paredes destes canais é possível observar os poros, que permitem a permeação de líquidos durante transporte de seiva na planta. Estes poros são importantes durante hidrólise, pois representam os pontos onde se inicia a desestruturação da fibra organizada tal como se apresenta no bagaço.



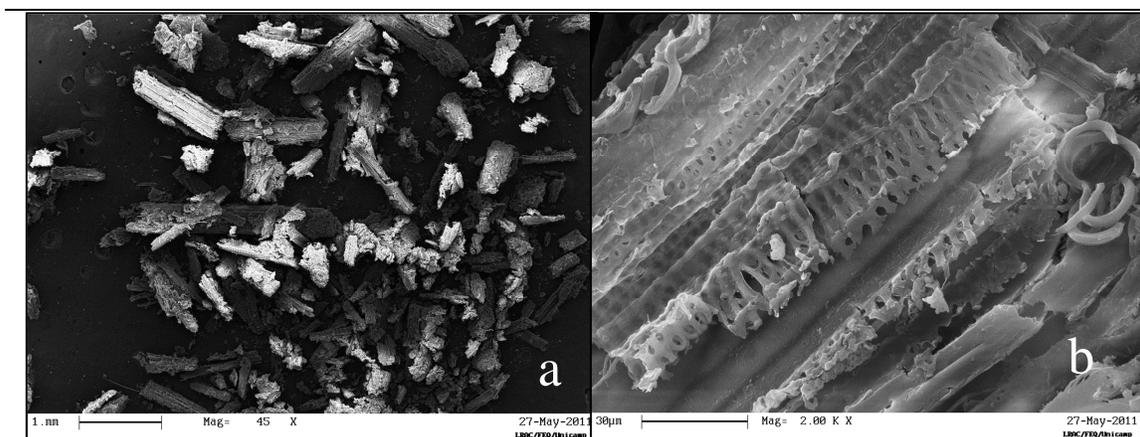
**Figura 28.** Bagaço de cana de açúcar *in natura*. Fotografia eletrônica de varredura. Direita: vista longitudinal. Esquerda: vista transversal. Ambas em aumento de 2.000x.

Após tratamento térmico os poros vão se abrindo e a estrutura tridimensional da fibra começa a se desfazer. Tratamento hidrotérmico a 220°C por 5 min causa degradação da fibra do bagaço que pode ser vista na **Figura 29**. Neste caso, baseando-se nas fotos e nos resultados da análise de composição das frações do bagaço, pode-se afirmar que houve rompimento das cadeias amorfas de hemicelulose e desestruturação das cadeias cristalinas de celulose.



**Figura 29.** Bagaço hidrotermicamente tratado a 220°C/5min. Fotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura. (a) Aumento de 450x (b) Aumento de 2.000x.

Em tratamento mais drástico, 220°C por 15 min, o resíduo sólido obtido apresenta-se sob a forma de partículas menores que aquelas do bagaço *in natura* (**Figura 30a**) e é constituído basicamente pela estrutura cristalina de celulose. Neste caso os poros já se apresentam abertos de tal forma que toda a estrutura da fibra foi praticamente desfeita. Houve liberação de toda a hemicelulose, restando apenas um esqueleto estrutural de celulose (**Figura 30b**), constatado pelo teste de determinação da fração celulósica.



**Figura 30.** Bagaço hidrotermicamente tratado a 220°C/15min. Fotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura. (a) Aumento de 450x (b) Aumento de 2.000x.

Pode-se verificar que o tratamento térmico em presença de água é capaz de remover as frações constituintes do material hemicelulósico. Devido às características peculiares a cada

fração, o tratamento pode ser específico para cada grau de desestruturação do material que pretende-se alcançar a fim de se obter diferentes hidrolisados. Claramente, observou-se que a estrutura hemicelulósica é mais sensível á hidrólise térmica. O que se deve tanto pela sua organização estrutural amorfa quanto pela posição na configuração das fibras.

### 5.3.2. Fermentação

A concentração dos açúcares em cada etapa da hidrólise (bagaço hidrolisado térmica e enzimaticamente) pode ser verificada na **Tabela 13**, abaixo:

**Tabela 13.** Concentrações de açúcares e ácido acético encontrados no hidrolisado obtido a partir de 100 g de bagaço da cana de açúcar diluído em 1150 mL de água após hidrólise térmica (220°C/5 min/24.2 bar/ 345 rpm) seguida de hidrólise enzimática por Celulase 15 FPU, Celobiase 60 CBU e Xilanase 300 XU por grama de matéria seca.

	glicose (g)	xilose (g)	arabinose (g)	ácido acético (g)
Hidrólise térmica	12,3	21,5	0,2	3
Hidrólise térmica + Hidrólise enzimática	41	25	0,5	5

No hidrolisado final o teor de açúcares livres chegou a 66 g L<sup>-1</sup>.

Após hidrólise enzimática, nenhuma celulose ou hemicelulose foi detectada. O meio de cultivo MRS<sub>HT</sub> continha 51,37 g L<sup>-1</sup> de monossacarídeos totais (essencialmente glicose e xilose).

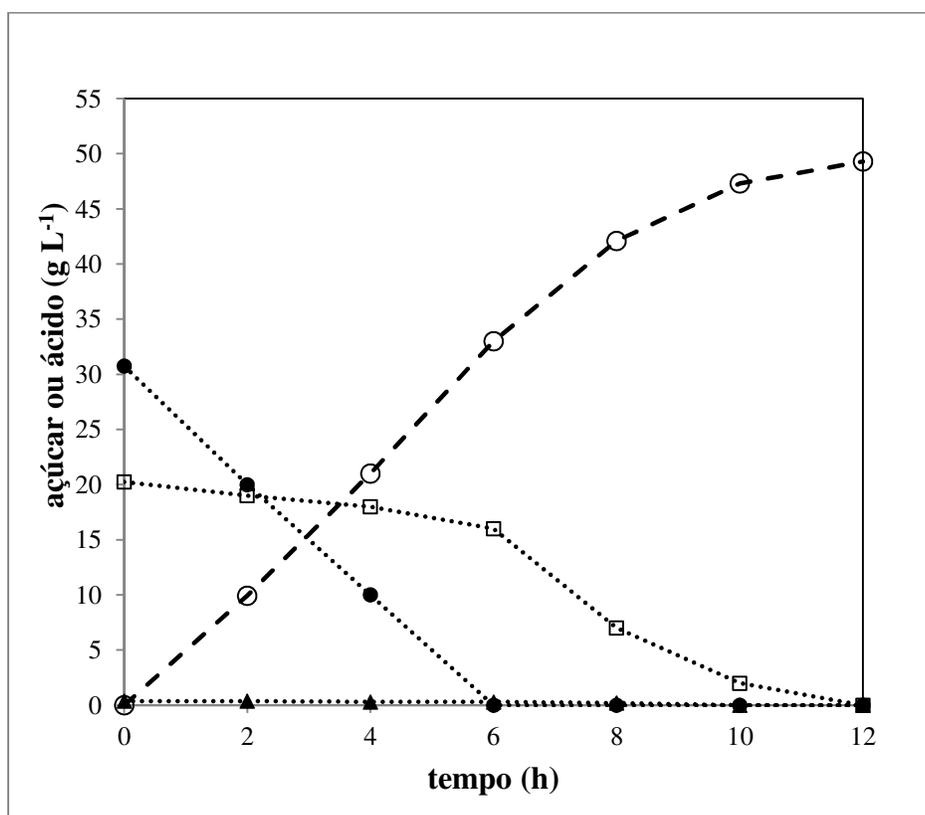
**Tabela 14.** Parâmetros cinéticos no crescimento de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo contendo hidrolisado

S <sub>0</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub>	Q <sub>p</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )
Xilose (20)	0,96	4,11	2,8
Glicose (31)			

Na fermentação foi obtido rendimento de 0,96 e produtividade volumétrica igual a 4,11 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> na produção de ácido lático. Não foi detectado residual de açúcares ao fim da fermentação ou produção de ácido acético.

*B. coagulans* 162 mostrou em outros estudos grande potencial para converter os açúcares naturalmente presentes em resíduos lignocelulósicos a ácido lático. PATEL *et al.* (2004) isolaram

uma linhagem identificada como *B. coagulans* 17C5 capaz de converter o hidrolisado da cana de açúcar em ácido láctico e concentrações muito baixas de etanol, ácido acético, ácido fórmico e ácido succínico. Mais recentemente, alguns estudos mostraram a habilidade da linhagem *Bacillus coagulans* em produzir ácido láctico a partir de hidrolisados lignocelulósicos ricos em pentoses, especialmente xilose (MAAS *et al.*, 2008; WALTON *et al.*, 2010).



**Figura 31.** Fermentação de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo contendo hidrolisado do bagaço da cana de açúcar obtido através de hidrólise hidrotérmica seguida de hidrólise enzimática.

---●--- glicose    ---□--- xilose    ---▲--- arabinose    - ⊖ - ácido láctico

OU *et al.* (2010) obtiveram de xilose e glicose, altos níveis de ácido láctico, 160 e 180 g l<sup>-1</sup> respectivamente, usando a espécie *B. coagulans* 36D1 em regime de batelada alimentada. Quando batelada alimentada foi conduzida simultaneamente com sacarificação (SSF) de celulose cristalina comercial (SOLKA FLOC) por enzimas fúngicas (Biocellulase W, KERRY BIOSCIENCES, Cork, Ireland), foi alcançado 80 g l<sup>-1</sup> de ácido láctico e rendimento próximo a 80%, a 50 °C e pH 6,0. Para evitar a inibição causada pelo produto, os autores usaram CaCO<sub>3</sub> para sequestrar o ácido láctico.

WALTON *et al.* (2010) utilizaram *B. coagulans* linhagem MXL-9 para conversão de extratos hemicelulósicos contendo 45, 21,4 e 15,6 g l<sup>-1</sup> de monossacarídeos totais. Os autores obtiveram conversão de 90% da xilose (20 g l<sup>-1</sup>) em ácido láctico (18 g l<sup>-1</sup>) em meio controle sem inibidores. Seus resultados são próximos àqueles encontrados em nossos estudos utilizando meio sintético MRS<sub>GAX</sub> (85%). Eles obtiveram 40,5 g l<sup>-1</sup> de ácido láctico a partir de 45,8 g l<sup>-1</sup> de monossacarídeos, alcançando eficiência de 88,6% após 50 h. Em experimentos contendo inibidores, foi observada fase lag. Após 58 h, 44 g l<sup>-1</sup> de açúcares foi convertida a 33 g l<sup>-1</sup> de ácido láctico alcançando eficiência de 75%.

PATEL *et al.* (2004, 2005, 2006) relataram o uso de espécies isoladas, *Bacillus* sp. linhagem 17C5, *Bacillus* sp. Strain 36D1 e *Bacillus coagulans* para conversão de açúcares contidos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. Os microrganismos mostraram habilidade em converter hexose e pentose presentes no xarope de hidrolisado da cana de açúcar suplementado com corn steep liquor.

Em nossos estudos, *Bacillus coagulans* 162 demonstrou preferência pelo “uptake” de glicose em detrimento da xilose ou arabinose em vários testes (frascos agitados, batelada e fermentação semi-contínua). Diferentemente, TEMUDO *et al.* (2009) não observou distinção entre a captura de glicose e xilose em meio de cultivo onde ambos estavam presentes como substrato por cultura mista composta por duas linhagens de bactérias lácticas isoladas.

Dentre várias características desejáveis para um organismo utilizado biotecnologicamente, *Bacillus* sp apresenta alta eficiência na conversão de carboidratos, relativa tolerância a inibidores naturalmente presentes em hidrolisados hemicelulósicos, alta temperatura de crescimento limitando crescimento de competidores e compatível com a temperatura de hidrólise enzimática, não necessidade de esterilização em plantas industriais e segurança à saúde humana. Manipulação genética pode ser explorada; conhecimento do compostamento da linhagem selvagem é o primeiro passo.

#### 5.4. Conclusão

A hidrólise térmica foi mais efetiva na remoção da fração hemicelulósica do bagaço in natura. A fração sólida residual do bagaço continha essencialmente celulose, que foi hidrolisada pelo uso das enzimas hidrolíticas.

Fermentação a partir de meio de cultivo  $MRS_{HT}$  contendo aproximadamente  $51,37 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares totais produziu  $49,30 \text{ g L}^{-1}$  de ácido láctico, alcançando  $Y_{p/x}$  igual 0,96. A fermentação em meio  $MRS_{HT}$  não apresentou fase lag possivelmente porque o inóculo foi adaptado previamente em meio contendo hidrolisado. Nas concentrações de ácido acético obtidas no meio contendo hidrolisado hidrotérmico não houve inibição do crescimento microbiano e na produção de ácido láctico.



## 6. CINÉTICA FERMENTATIVA DE *Bacillus coagulans* 162 EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO HIDROLISADO DO BAGAÇO EXPLODIDO A VAPOR

---

### 6.1. Resumo

A explosão a vapor consiste em aquecer o material úmido sob alta pressão e trazê-lo para uma região de baixa pressão em fração de segundos. O efeito da expansão do vapor de água entre as fibras do bagaço provoca a ruptura da fração hemicelulósica com consequente liberação de oligômeros e monômeros. A fração celulósica, como pode ser observada, foi bem menos afetada, tendo em vista que sua estrutura cristalina garante uma maior rigidez. Há liberação de lignina, bem como formação de inibidores HMF, furfural e ácido acético. A água de lavagem do bagaço explodido a vapor é composta essencialmente por xilose, componente principal da fração hemicelulósica, permanecendo a fração celulósica praticamente intacta. Neste tipo de processo, havendo interesse pela hidrólise da fração celulósica, é necessário lançar mão de processos enzimáticos.

Este estudo teve o objetivo de verificar o desempenho do *B. coagulans* 162 em meios de cultivos contendo hidrolisados do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor para produção de L-ácido láctico. A partir deste resíduo, três hidrolisados foram obtidos: 1) água de lavagem do bagaço, contendo essencialmente a fração hemicelulósica do bagaço; 2) água de lavagem concentrada por rota-evaporação e 3) bagaço hidrolisado enzimaticamente, contendo as frações hemicelulósica e celulósica.

Na fermentação da água de lavagem do bagaço explodido a vapor contendo 3,64 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais foi obtido rendimento (Yp/s) de 0,9 e produtividade volumétrica (Qp) igual a 0,225 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Na fermentação da água de lavagem do bagaço explodido a vapor concentrado por rota-evaporação, contendo 125 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais foi obtido rendimento (Yp/s) de 0,9 e produtividade volumétrica (Qp) igual a 0,081 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Na fermentação do hidrolisado obtido a partir do bagaço explodido a vapor hidrolisado enzimaticamente contendo 46 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais foi obtido rendimento (Yp/s) de 0,85 e produtividade volumétrica (Qp) igual a 0,095 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

## **6.2. Materiais e métodos**

### **6.2.1. Obtenção dos hidrolisados**

Para obtenção dos hidrolisados foram utilizados bagaço explodido, gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia canaveira (CTC), localizado em Piracicaba, SP.

#### **6.2.1.1. Água de lavagem do bagaço explodido a vapor**

O bagaço explodido a vapor e água destilada foram misturados numa proporção de 1:9 e a mistura foi agitada a 300 rpm e 50°C por 2 horas. A mistura final foi filtrada e a fração líquida utilizada como fonte de açúcares para fermentação.

#### **6.2.1.2. Água de lavagem do bagaço explodido concentrado por rota-evaporação**

A água de lavagem obtida no item 6.2.1.1 foi concentrada em rota-evaporador a 30°C. Os teores de inibidores e açúcares foram analisados.

#### **6.2.1.3. Bagaço explodido a vapor seguido de hidrólise enzimática**

Uma mistura de bagaço explodido e água destilada na proporção 1:9 (base seca) foi estabilizada à temperatura de 50°C. O pH foi ajustado com CaCO<sub>3</sub> para 4,8. As enzimas celulase (15 FPU/g bagaço seco), celobiase (60 CBU/g bagaço seco) e xilanase (300 XU/g bagaço seco) (NOVOZYMES, Dinamarca) foram adicionadas e a mistura de reação foi agitada a 50 rpm por 48 h. O extrato resultante foi filtrado, a fração sólida foi descartada e a fração líquida utilizada como fonte de açúcares para fermentação.

### **6.2.2. Caracterização do bagaço explodido a vapor**

A caracterização química dos bagaços *in natura* e explodido a vapor foi feita empregando a metodologia analítica desenvolvido por ROCHA *et al.* (1997), validado por GOUVEIA *et al.* (2009) e descrito por DA SILVA (2009). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **6.2.2.1. Preparo da amostra – Hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Os bagaços foram secos em estufa (60°C) até obtenção de peso constante. O material foi triturado em partículas de 20 mesh. Amostras com 1 g (base seca) foram pesadas em balança semi-analítica (0,01 g de precisão) e transferidas para tubos de ensaio (70 mL) para ser tratadas com 10 mL de ácido sulfúrico 72% sob agitação vigorosa em banho termostaticado a 45,0 ± 0,5°C por 7 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada. A amostra foi quantitativamente transferida para frascos Erlenmeyer (500 mL) que teve seu volume completo

para 275 mL. Hidrólise completa dos oligômeros remanescentes foi realizada fechando-se os erlenmeyers com papel alumínio e submetendo-os a autoclave por 30 min a 1 kgf/cm<sup>2</sup> a 121°C. Após descompressão, os Erlenmeyers foram retirados e trazidos para a temperatura ambiente. A mistura de reação foi filtrada (Whatman n°4) e o filtrado transferido para um frasco volumétrico (500 mL) completo com a água de lavagem do material retido no filtro. A fração sólida foi usada para determinação de lignina insolúvel (lignina de Klason) e cinzas. A fração líquida foi usada para determinação de açúcares (glicose, xilose, arabinose e celobiose), lignina solúvel e inibidores (ácido acético, furfural e HMF).

#### **6.2.2.2. Métodos analíticos**

##### **6.2.2.2.1. Determinação de açúcares**

Glicose, xilose e arabinose foram determinadas por cromatógrafo de íons em equipamento METROHM, composto por bomba Professional IC 850 Anion-MCS-LP Gradient, amostrador com injeção automática 863 Compact Auto Sampler, detector amperiométrico 871 Advanced Bioscan e interface 771 IC Compact. Foram usadas duas colunas Metrosep Carb 1-150 (copolímero poliestireno/divinilbenzeno, tamanho da partícula de 5 µm; 150 x 4,0 mm) conectadas em série e NaOH 100 mM como fase móvel. Foi utilizado volume de injeção de 20 µL.

##### **6.2.2.2.2. Determinação de ácidos**

Os ácidos láctico, acético e fórmico foram determinados por cromatógrafo de íons acima citado. Foi usada coluna Metrosep Organic Acid (250 x 7,8 mm), METROHM AG CH 9101, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM como fase móvel. Foi usado volume de injeção de 196 µL.

##### **6.2.2.2.3. Determinação de furfural e HMF**

Furfural e HMF foram determinados por HPLC (high-performance anion-exchange chromatography) em equipamento WATERS (USA) composto por uma coluna C18 modelo Delta Pak (150 x 3,9mm) 5µm, 300Å com pré-coluna, estabilizado à temperatura de 25°C. Equipado com bomba modelo 515 e auto-sampler modelo 717. A detecção foi feita por detector UV modelo 486 a 280 nm. Foi utilizado fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção: 10 µL. A análise foi monitorada pelo Software Empower 2,

##### **6.2.2.2.4. Determinação de células totais e viáveis**

Células totais e viáveis foram determinadas de acordo com metodologia descrita no item 3.2.3.3.3.

### 6.2.2.3. Cálculos

#### 6.2.2.3.1. Determinação do teor de açúcares

O teor de açúcares foi calculado de acordo com o descrito por RABELO (2010) através da equação

$$(\%) = \frac{(C \times f_c \times V_f)}{M_s} \times 100\% \quad (\text{eq. 7})$$

Onde:

C = concentração de açúcar na amostra (g L<sup>-1</sup>)

F<sub>c</sub> = fator de correção do método

V<sub>f</sub> = volume final do hidrolisado (0,285 L)

M<sub>s</sub> = peso seco da amostra (g)

#### 6.2.2.5.2. Determinação do teor de celulose

O teor de celulose foi determinado baseando-se no teor de celulose e glicose de acordo com a equação:

$$\text{Celulose (\%)} = \frac{M_c(0,95) + M_G(0,90)}{M_s} \times 100\% \quad (\text{eq. 8})$$

Onde:

M<sub>C</sub> = teor de celulose

M<sub>G</sub> = teor de glicose

M<sub>S</sub> = peso da amostra

#### 6.2.2.5.3. Determinação do teor de hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado utilizando-se os teores de xylose e arabinose multiplicados pelo fato 0,88 de acordo com a equação que se segue:

$$\text{Hemicelulose (\%)} = (M_x + M_A) \times 0,88 \times 100\% \quad (\text{eq. 9})$$

Onde:

M<sub>x</sub> = teor de xilose

M<sub>A</sub> = teor de arabinose

#### 6.2.2.5.4. Determinação do teor de lignina solúvel

A lignina solúvel foi medida utilizando-se espectrofotometria. Amostra diluída convenientemente foi lida a 220nm e a quantificação foi feita mediante curva padrão.

#### 6.2.2.5.5. Determinação do teor de lignina insolúvel

O material remanescente no filtro foi lavado com 4l de água destilada (até aproximadamente pH 7,0) para completa remoção de ácido residual. Os filtros foram secos em estufa a 80°C até peso constante. A porcentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação ao material lignocelulósico descontando o peso das cinzas. A lignina de Klason foi determinada de acordo com FUENTES (2009):

$$\text{Lignina de Klason (\%)} = \frac{M - (m_f + m_a)}{M_S} \times 100\% \quad (\text{eq. 10})$$

Onde:

M = peso seco filtro + lignina insolúvel + cinzas (g)

m<sub>f</sub> = peso do filtro seco (g)

m<sub>a</sub> = peso das cinzas (g)

M<sub>S</sub> = peso das amostras secas (g)

#### 6.2.2.5.6. Determinação dos teores de cinzas

O material seco remanescente nos filtros foi colocado em cadinhos de porcelana previamente tarados e calcinados. Os cadinhos foram então pré-calcinados a 400°C por 1 h e então calcinados a 800°C por 2 h. O resíduo obtido foi pesado.

### 6.2.3. Fermentação

#### 6.2.3.1. Microrganismo

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Bacillus coagulans* 162, obtida da coleção de microrganismos do ATB – Leibnitz Institute for Agricultural Engineering (Potsdam, Alemanha) e conservada de acordo com o descrito no item 3.2.3.2.

#### 6.2.3.2. Meios de cultivo

Foram preparados três meios de cultivo contendo os hidrolisados obtidos da água de lavagem (1), água de lavagem concentrado por rota-evaporação (2) e bagaço explodido a vapor hidrolisado enzimaticamente (3). Os meios de cultivo contendo hidrolisado do bagaço da cana de açúcar

explodido a vapor foram denominados MRS<sub>SE1</sub>, MRS<sub>SE2</sub> e MRS<sub>SE3</sub>, respectivamente. Os meios de cultivo continham extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>); sulfato de magnésio (0,1 g L<sup>-1</sup>); sulfato de manganês (0,05 g L<sup>-1</sup>) e hidrolisado. Os hidrolisados foram esterilizados separadamente (118°C/15min) para evitar reações de escurecimento não enzimáticas e, para preparo do meio de cultivo, foram adicionados à solução concentrada de nutrientes na proporção de 1:3 (solução nutriente concentrada:hidrolisado).

#### **6.2.3.3. Inóculo**

Uma alçada de células jovens (24 h) foi inoculada em 80 mL de meio de cultivo MRS modificado acima descrito, contido em frasco Erlenmeyer (250 mL). O frasco foi submetido a 52°C a 150 rpm por 18 h.

#### **6.2.3.4. Experimento**

A fermentação foi realizada em batelada em biorreator Newbrunswik (USA), com capacidade de 2 L de volume útil. Inicialmente, o inóculo (80 mL) foi adicionado a 720 mL de meio estéril contido no biorreator. O pH 6,0 foi mantido constante pela adição de solução de NaOH 20%. O sistema foi submetido à agitação de 150 rpm e temperatura de 52°C.

Amostras foram retiradas a cada 2 h para obtenção da cinética de crescimento microbiano, determinação de ácido lático, ácido acético, ácido fórmico, glicose, xilose e arabinose.

#### **6.2.3.5. Procedimentos analíticos**

O meio fermentado foi filtrado em membrana de 0,22 µm Millipore, convenientemente diluído e levado para análise em cromatógrafo.

##### **6.2.3.5.1. Determinação de açúcares**

Glicose, xilose e arabinose foram determinadas conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.1.

##### **6.2,3,5.2, Determinação de ácidos**

Os ácidos lático, acético e fórmico foram determinados conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.2.

##### **6.2,3,5.3, Determinação de células totais e viáveis**

O número de células totais e viáveis foi determinado conforme metodologia descrita no item 3.2.3.3.3.

#### 6.2.3.5.4. Quiralidade do ácido lático

A quiralidade do ácido lático foi determinada utilizando-se kit D-lactic acid / L-lactic acid BOEHRINGER MANNHEIM (fabricante Boehringer Mannheim GmbH, Germany).

#### 6.2.3.5.5. Determinação de furfural e HMF

Furfural e HMF foram determinados de acordo com metodologia descrita no item 6.2.2.2.3.

### 6.3. Resultados e discussão

#### 6.3.1. Caracterização do bagaço

Após tratamento de explosão a vapor pode-se verificar que grande parte da fração hemicelulósica foi liberada para o meio sob a forma de oligômeros e monômeros. A fração celulósica também sofreu perda parcial, mas em quantidade significativamente inferior à de hemicelulose (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Frações obtidas do bagaço antes e após tratamento de explosão a vapor

	<b>Bagaço <i>in natura</i></b>	<b>Bagaço explodido a vapor</b>
celulose	30	27
hemicelulose	23	4

Com a remoção da fração de hemicelulose, a estrutura de celulose fica enfraquecida, uma vez que estas duas estruturas se apresentam intimamente ligadas, o que torna a estrutura cristalina da celulose mais acessível ao ataque de enzimas líticas, empregadas numa posterior etapa de hidrólise enzimática.

### 6.3.2. Obtenção dos hidrolisados

A concentração dos principais componentes encontrados nos hidrolisados do bagaço explodido a vapor podem ser vistos **Tabela 16**, abaixo:

**Tabela 16.** Concentrações encontradas nos diferentes hidrolisados obtidos a partir do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor (100 g de bagaço seco/900 g de água destilada).

	Xilose (g L <sup>-1</sup> )	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Arabinose (g L <sup>-1</sup> )	HMF (ppm)	Furfural (ppm)	Ácido acético (g L <sup>-1</sup> )
<i>Água de lavagem</i>	3,62	1,04	0,30	363	497	1,89
<i>Água de lavagem concentrada por rota- evaporação</i>	134	25	8	12 406	2 620	15
<i>Bagaço explodido seguido de hidrólise enzimática</i>	21	36	4	390	500	3

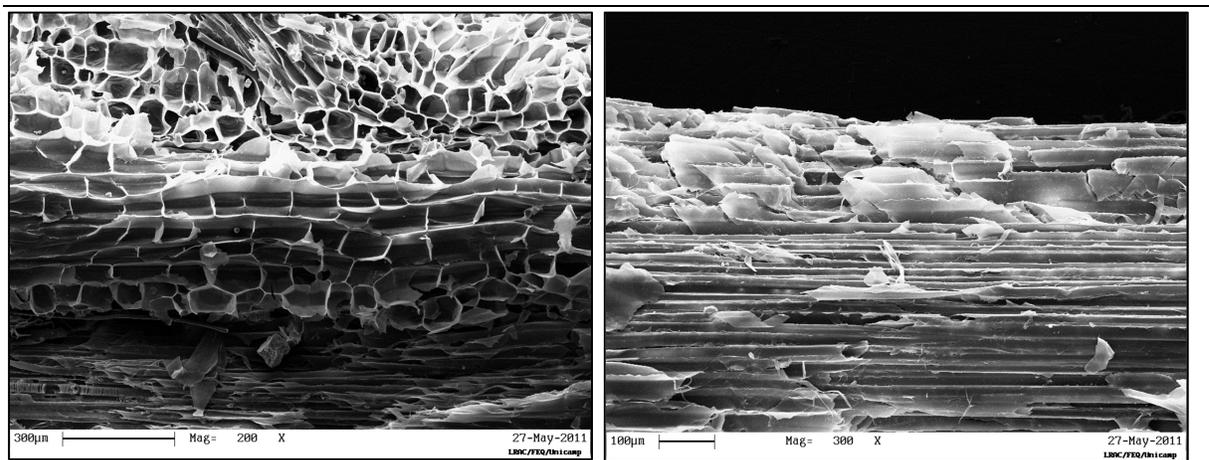
Na água de lavagem do bagaço explodido a vapor pode-se verificar maior concentração de xilose que glicose, devido à degradação essencialmente da fração hemicelulósica.

Durante concentração da água de lavagem por rota-evaporação, houve partição do furfural para a fração evaporada, o que é desejável do ponto de vista de processo fermentativo. Entretanto, o mesmo não ocorreu com o HMF, que permaneceu no concentrado.

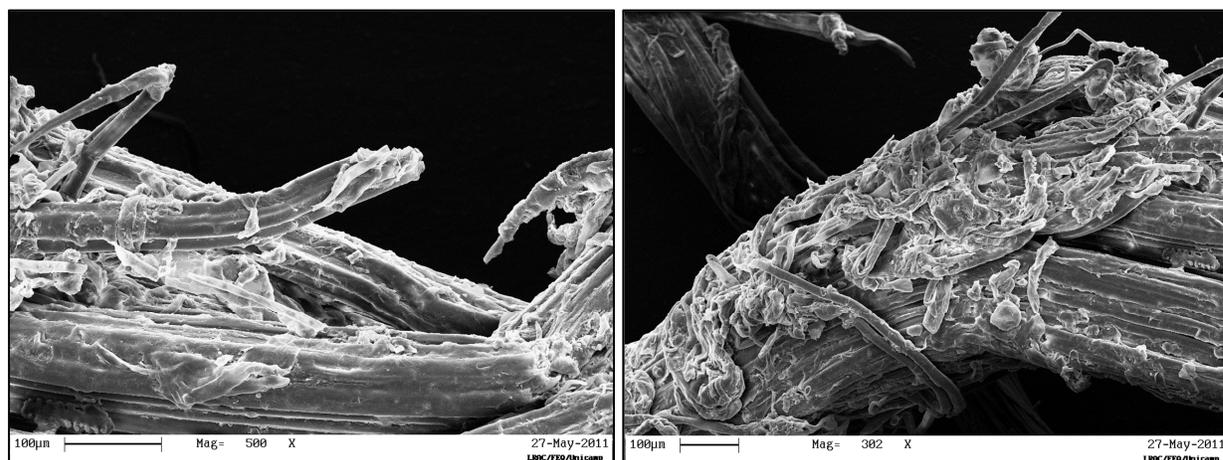
A hidrólise enzimática do bagaço explodido a vapor não gerou estatisticamente significativo furfural e HMF no hidrolisado. Toda a fração celulósica e hemicelulósica foi degradada liberando os monômeros de açúcares.

Devido ao alto teor de inibidores encontrado no hidrolisado concentrado por rota-evaporação, o processo de detoxificação foi realizado. Foi utilizado carvão ativado na concentração de 5% em relação à massa de bagaço. A mistura foi agitada por 2 h à temperatura ambiente em agitador orbital e filtrado em papel WHATMAN n°4.

O efeito que o tratamento por explosão a vapor provoca na estrutura da fibra do bagaço pode ser visualizado comparando-se as **Figuras 32 e 33**, Quando a fração hemicelulósica se degrada, a fração celulósica fica mais exposta e acessível à ação de enzimas celulolíticas. Além disso, há liberação de oligômeros e monômeros (xilose e arabinose, essencialmente).



**Figura 32.** Fotografia eletrônica de varredura do bagaço *in natura*. Aumento de 2.000x.



**Figura 33.** Fotografia eletrônica de varredura do bagaço explodido a vapor. Aumento de 5 000x.

Comparando-se as imagens do bagaço antes e após tratamento por explosão a vapor pode-se observar claramente o efeito que este exerce sobre as fibras do material lignocelulósico. Além do efeito de fragmentação do material, pode-se verificar que a fração celulósica fica mais exposta e há liberação de monômeros e oligômeros constituintes da fração hemicelulósica. A estrutura fibrosa, antes organizada longitudinalmente, após tratamento de explosão a vapor, rompe-se e contorce-se

sob seu próprio eixo. Porém, associado à liberação de açúcares, pode-se observar também a conversão destes em compostos de coloração escura, ocasionados por reações de escurecimento não enzimático como o furfural e o hidroximetilfurfural. Além disso, pode-se verificar em análises cromatográficas a formação de ácido acético, pela liberação de grupos acetil das pentosanas.

### 6.3.3. Fermentação

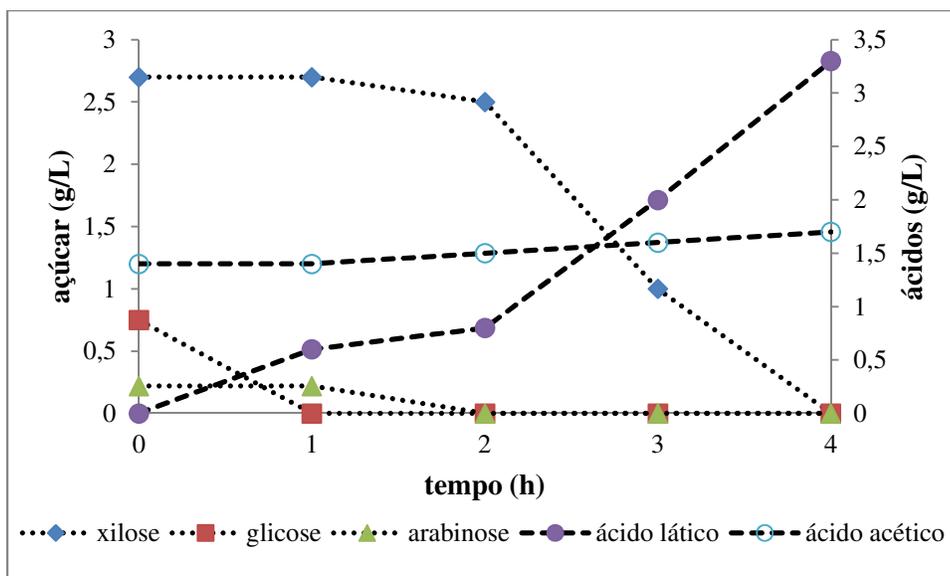
Como o extrato de levedura fornece carboidratos para fermentação além de fatores de crescimento, foi preciso considerar a quantidade de ácido lático e biomassa foram produzidos a partir deste substrato como fonte exclusiva de carbono nos cálculos de rendimento em produto e células. Foi feito um teste em agitador orbital para determinar qual a quantidade de biomassa e ácido lático foram produzidos a partir somente do extrato de levedura que estava presente no meio. Observou-se que  $4 \text{ g L}^{-1}$  de biomassa e  $5 \text{ g L}^{-1}$  de ácido lático são obtidos a partir de  $15 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura.

Os meios de cultivo obtidos a partir dos hidrolisados continham menor concentração de açúcares devido à diluição ocasionada pela adição de compostos nutrientes essenciais como fatores de crescimento microbiano. Na **Tabela 17** pode-se visualizar a concentração dos principais componentes do hidrolisado no meio de cultivo:

**Tabela 17.** Concentrações encontradas nos diferentes meios de cultivo obtidos a partir dos hidrolisados do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor

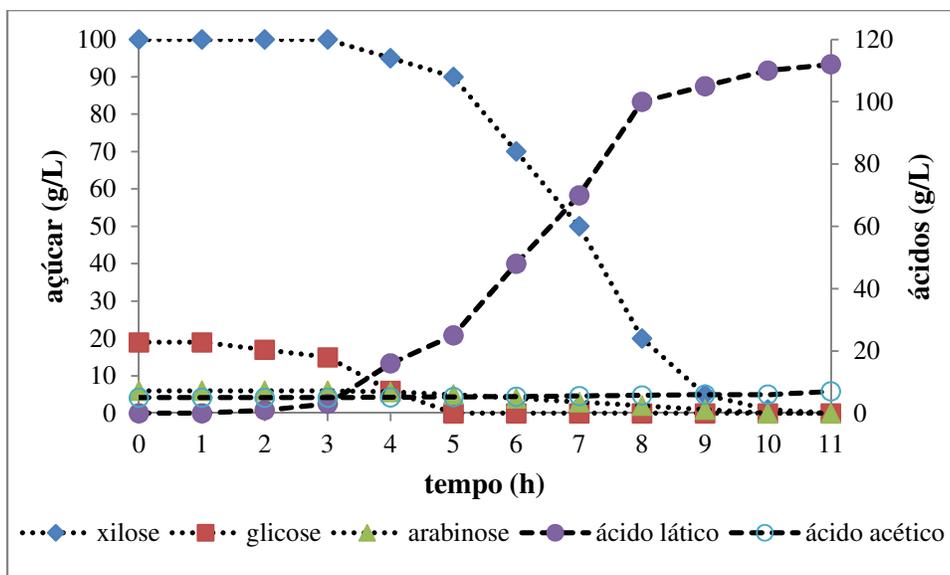
	Xilose ( $\text{g L}^{-1}$ )	Glicose ( $\text{g L}^{-1}$ )	Arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ )	HMF (ppm)	Furfural (ppm)	Ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ )
MRS <sub>SE1</sub>	2,7	0,75	0,22	0,275	0,370	1,40
MRS <sub>SE2</sub>	100	19	6	<10	<10	5
MRS <sub>SE3</sub>	16	27	3	300	375	2,25

Na fermentação da água de lavagem do bagaço explodido a vapor contendo  $3,64 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares totais (MRS<sub>SE1</sub>) foi obtido rendimento ( $Y_{p/s}$ ) de 0,9 e produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) igual a  $0,225 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A fermentação finalizou em 4 h produzindo predominantemente ácido lático (**Figura 34**).



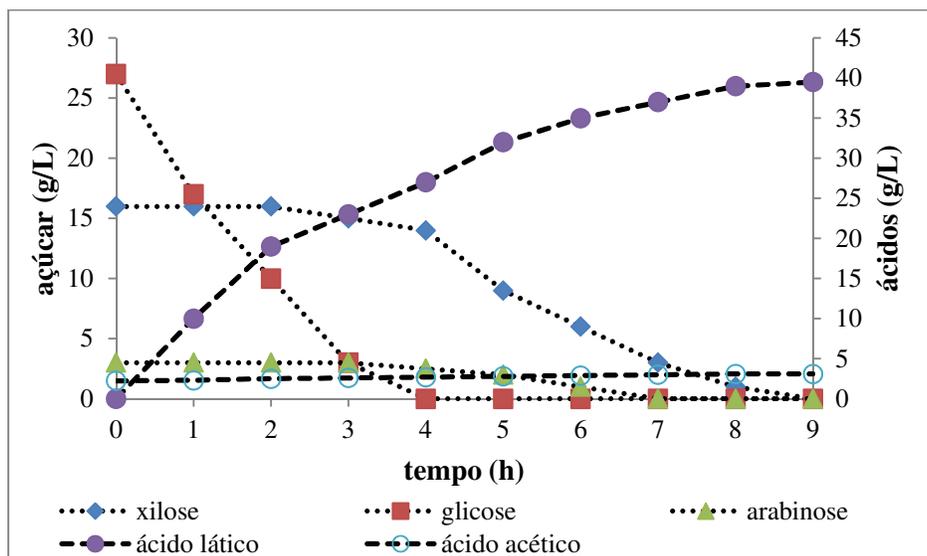
**Figura 34.** Fermentação do meio de cultivo MRS<sub>SE1</sub> contendo água de lavagem do bagaço de cana de açúcar explodido a vapor

Na fermentação da água de lavagem do bagaço explodido a vapor concentrado por rota-  
evaporação, contendo  $125 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares totais (MRS<sub>SE2</sub>) foi obtido rendimento ( $Y_p/s$ ) de 0,9 e  
produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) igual a  $0,081 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A fermentação finalizou em 11 h  
produzindo predominantemente ácido lático (**Figura 35**). Houve presença de fase lag devido  
provavelmente à maior concentração de açúcares e/ou ácido acético inicialmente no meio.  
Contudo, o rendimento parece não ter sido comprometido.



**Figura 35.** Fermentação do meio de cultivo MRS<sub>SE2</sub> contendo água de lavagem do bagaço de cana de açúcar explodido a vapor concentrado por rota-  
evaporação e detoxificado.

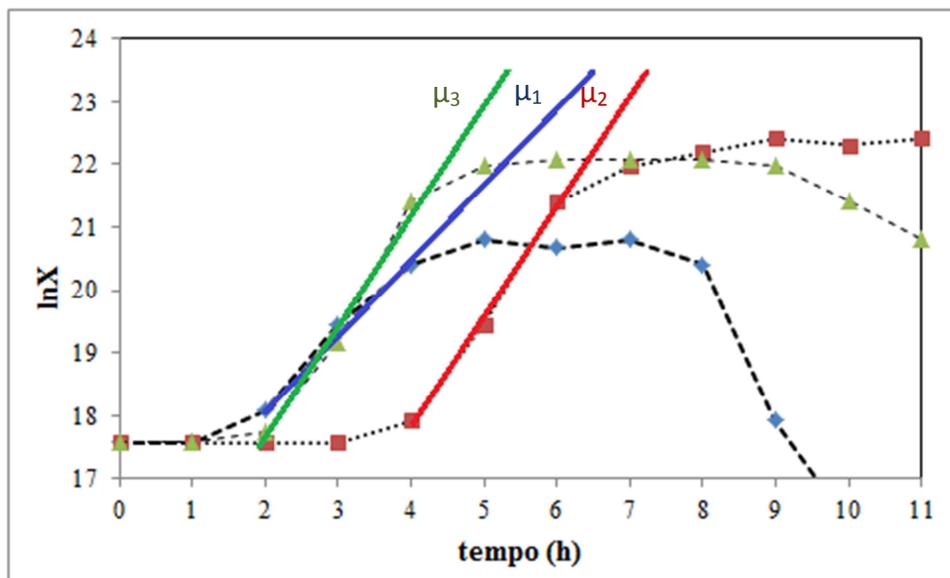
Na fermentação do hidrolisado obtido a partir do bagaço explodido a vapor hidrolisado enzimaticamente contendo  $46 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares totais (MRS<sub>SE3</sub>) foi obtido rendimento ( $Y_p/s$ ) de 0,85 e produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) igual a  $0,095 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . A fermentação finalizou em 9 h produzindo predominantemente ácido láctico (**Figura 36**).



**Figura 36.** Fermentação do meio de cultivo MRS<sub>SE3</sub> contendo bagaço de cana de açúcar explodido a vapor seguido por hidrólise enzimática.

Como verificado anteriormente em meio sintético, *B. coagulans* 162 utilizou preferencialmente a glicose em sua via fermentativa. Alguns autores atribuem o consumo da glicose à via EMP. Somente quando a glicose se esgota do meio, o microrganismo se adapta para consumir as pentoses disponíveis, neste caso, xilose e arabinose, e provavelmente o faz pela via das Pentose-fosfato, tendo em vista o alto rendimento em ácido láctico. Pequena quantidade de ácido acético é produzida, mas não suficiente para caracterizar esta como uma fermentação heterolática.

O número de células totais aumentou com o aumento da concentração de açúcares no meio (Figura 37). No meio com maior concentração de açúcares (125 g L<sup>-1</sup>) pode-se observar presença de fase lag. A bactéria precisou de algum tempo para se adaptar ao meio de cultivo.



**Figura 37.** Curva de crescimento de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo contendo diferentes hidrolisados do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor.

---◆--- MRSsE1    ...■... MRSsE2    ---▲--- MRSsE3

Parece claro o potencial do *B. coagulans* 162 para conversão dos açúcares naturalmente presentes nos resíduos lignocelulósicos em ácido lático. Outras bactérias pertencentes à mesma espécie também mostraram esta característica. PATEL *et al.* (2004) isolaram a linhagem *B. coagulans* 17C5 capaz de converter o hidrolisado do bagaço da cana de açúcar em ácido lático e quantidade muito baixa de etanol, ácido acético, ácido fórmico e ácido succínico. Mais recentemente, alguns estudos mostraram a habilidade de linhagens de *Bacillus coagulans* na produção de ácido lático de hidrolisados lignocelulósicos ricos em pentoses, especialmente xilose (MAAS *et al.*, 2008; WALTON *et al.*, 2010).

OU *et al.* (2010) obtiveram de xilose e glicose altos níveis de ácido lático, 160 e 180 g L<sup>-1</sup> respectivamente, usando o microrganismo *B. coagulans* 36D1 em batelada alimentada. Quando o processo de batelada alimentada foi combinada com sacarificação simultânea de celulose cristalina comercial por enzimas fúngicas foi alcançada concentração de 80 g L<sup>-1</sup> de ácido lático e

rendimento próximo a 80%, a 50°C e pH 6,0, Para superar a inibição causada pelo produto, os autores utilizaram CaCO<sub>3</sub> para sequestrar o ácido lático.

A **Tabela 18** mostra os dados cinéticos obtidos durante a fermentação. Em todas as fermentações foram observadas a formação essencialmente L-ácido lático (99% pureza), utilizando meio hidrolisado ou sintético.

**Tabela 18.** Dados cinéticos obtidos na fermentação de hidrolisados por *B. coagulans* 162.

Meio de cultivo	S <sub>0</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub>	Q <sub>p</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )
MRS <sub>SE1</sub>	Arabinose (0,22)	0,90	0,225	0,8
	Xilose (2,7)			
	Glicose (0,75)			
MRS <sub>SE2</sub>	Arabinose (6)	0,90	0,081	1,25
	Xilose (100)			
	Glicose (19)			
MRS <sub>SE3</sub>	Arabinose (3)	0,85	0,095	1,3
	Xilose (16)			
	Glicose (27)			

Quando se trabalha com hidrolisado lignocelulósico alguns obstáculos precisam ser superados. Dentre os vários componentes no processo fermentativo como o microrganismo selecionado, o substrato utilizado, as enzimas necessária, o custo com o substrato aparece como fator chave para determinação da viabilidade econômica do processo. Entretanto, quando se fala em conversão de materiais lignocelulósicos este fator chave passa a ser o custo com a hidrólise, o que pode ser interpretado como custo com enzimas celulolíticas ou energia gasta em processos térmicos. Entre estes dois, com certeza o custo com enzimas é o limitante. Então, a inviabilidade da utilização de matérias primas lignocelulósicas é devida ao custo elevado das enzimas necessárias para a hidrólise, o que onera a produção em escala industrial. Outro problema enfrentado na utilização de hidrolisados de resíduos é a dificuldade de se concentrar os açúcares uma vez que a eficiência do tratamento térmico na hidrólise depende do contato das fibras com a água. Com pouca quantidade de água o tratamento pode não ser efetivo e haver desperdício do potencial energético empregado na lise das cadeias hemicelulolíticas. Entretanto, com excesso de água, o hidrolisado se torna mais diluído onerando o custo pela necessidade de volume maior durante processamento.

Quando se utiliza resíduos como substrato para qualquer processo fermentativo, seja para a produção de bioetanol, ácido lático ou qualquer outro químico biotecnologicamente, um pré-tratamento se faz necessário para aumentar a extração dos açúcares com potencial fermentativo. Ou ainda para aumentar a acessibilidade das ligações glicosídicas para ação das enzimas lignocelulósicas pela remoção essencialmente da fração de lignina. Vários pré-tratamentos têm sido testados como o emprego de ácidos orgânicos (XU *et al.*, 2009), amônia e água quente (KIM & LEE, 2005), oxidação úmida (VARGA *et al.*, 2004) e explosão a vapor (KOVACS *et al.*, 2009).

Para definir o melhor pré-tratamento o custo precisa ser avaliado uma vez que enzimas são caras comparadas ao ácido sulfúrico, por outro lado o alto nível de íons inorgânicos após tratamento ácido complica a etapa de separação. Por isto, o impacto no custo em posteriores etapas de separação e purificação precisa ser considerado (GARDE *et al.*, 2002).

O que é evidente, e o que vários autores têm feito menção (LEE, 1997), à necessidade de melhorar o processo tecnológico visando a utilização de matérias primas de baixo custo e utilização de fontes alternativas de energia como o etanol em detrimento de combustíveis fósseis, por exemplo.

A engenharia genética desempenha atualmente um importante papel na busca de alternativas biotecnológicas para produção de compostos químicos. Vários microrganismos têm sido desenvolvidos para converter açúcares de hidrolisados hemicelulósicos em químicos. ZHANG *et al.* (1995) adicionaram com sucesso genes de *Zymomonas mobilis* para produção de etanol em *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*, uma vez que *Zymomonas mobilis* não tem a habilidade de usar pentoses apesar de seu enorme potencial para conversão de glicose.

Apesar de todos os obstáculos enfrentados, não se pode ignorar a importância do uso da biotecnologia como alternativa para solucionar os problemas para substituição dos produtos químicos obtido por fontes fósseis por aqueles obtidos de fontes renováveis de energia. No cenário mundial, os bioplásticos compreendem uma soma de 10 a 15% de toda a produção de polímeros atualmente, um mercado que se projeta para aumentar para 25-30% até 2020 segundo alguns estudos. Num contexto onde o setor de plástico ainda é o maior no mercado da indústria petroquímica (WALTZ, 2008).

Desde que os mercados de biocombustíveis e biomateriais se apresentam como competidores, cada vez mais se pode afirmar que eles são, na verdade parceiros. E apesar de atualmente quase todos os incentivos para pesquisa e desenvolvimento serem legitimadas em prol

dos biocombustíveis, é indiscutível a necessidade e o crescimento, ainda que lento, do interesse no mercado mundial para o desenvolvimento de tecnologias que viabilizem a produção de bioplásticos. Sabe-se que para haver uma mudança de comportamento econômico por parte dos investidores, é preciso também que haja a criação de regulamentação que suporte estes avanços. Neste contexto, a Europa parece ter despertado mais cedo para este aspecto uma vez que, desde a década de 90, sua legislação tem sido revista e novas leis criadas com o objetivo de abrigar e dar suporte a essas novas tecnologias vindouras.

#### **6.4. Conclusão**

Ácido láctico com rendimento de 0,90, 0,90 e 0,86 foi obtido da fermentação utilizando *B. coagulans* 162 em meios de cultivo contendo, respectivamente, água de lavagem do bagaço explodido a vapor, água de lavagem do bagaço explodido a vapor concentrado por rota- evaporação e bagaço da cana de açúcar explodido a vapor hidrolisado enzimaticamente. A produtividade volumétrica foi menor no meio com maior concentração de açúcares ( $Q_p$  igual a  $0,081 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) devido a fase lag que se estabeleceu no processo.

Como foi observada, a presença de inibidores no hidrolisado do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor é constante. Nas fermentações realizadas, dentro da faixa de concentrações de inibidores no meio de cultivo, foi possível produzir ácido láctico com alto rendimento.

Entretanto, visando aumentar a produtividade, concentrar a água de lavagem pode representar aumento de custo ao processo e a inclusão de pelo menos duas etapas a ele: concentração do caldo e detoxificação. Encontrar uma linhagem tolerante aos inibidores é interessante do ponto de vista de processos, mas na prática não é algo simples.

Embora o microrganismo tenha necessitado de algum tempo para se adaptar ao meio contendo hidrolisado foi possível obter eficiências similares entre os três meios. Foi possível ainda verificar a presença de crescimento diáuxico, onde o microrganismo apresenta preferência pelo consumo da glicose em detrimento das pentoses, xilose e arabinose.

## 7. ESTUDO DE INIBIÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO E NO CRESCIMENTO DE *Bacillus coagulans* 162 POR:

- XILOSE
  - ÁCIDO ACÉTICO, FURFURAL E HMF
- 

### 7.1. Resumo

Materiais lignocelulósicos contêm açúcares polimerizados na forma de celulose e hemicelulose que podem ser liberados por hidrólise, e, subsequentemente, fermentados para produção de ácido lático por microrganismos, como por exemplo, *Bacillus coagulans* sp. Xilose e glicose são os principais açúcares obtidos de hidrolisados hemicelulósicos. Entretanto, o rendimento e produtividade do ácido lático podem ser prejudicados devido à presença de compostos inibidores, tais como ácidos fracos, furano derivados e compostos fenólicos gerados durante a hidrólise da lignocelulose.

Neste estudo, a habilidade do *Bacillus coagulans* 162 em diferentes concentrações de xilose foi avaliada. Ótimas condições de crescimento e nenhuma condição limitante além da concentração de xilose foram empregadas. A xilose foi escolhida para realização do experimento devido a sua presença predominante no hidrolisado hemicelulósico. O estudo de inibição por xilose foi realizado como o objetivo de explorar sua potencialidade na conversão em ácido lático em meios com alta concentração de açúcar, viabilizando sua aplicação industrial.

O estudo de inibição provocada por compostos naturalmente presentes nos hidrolisados lignocelulósicos é útil na medida em que fornece a faixa de concentração tolerada pelo microrganismo, tanto para multiplicação celular quanto para obtenção de produtos, fornecendo informações para se conhecer a necessidade da etapa de detoxificação, posteriormente à obtenção do hidrolisado e antes da fermentação.

*Bacillus coagulans* 162 apresentou em meio contendo apenas xilose rendimento máximo ( $Y_{x/s}$ ) igual a 0,95 quando 140 g L<sup>-1</sup> de açúcar inicial foi utilizado. Foi observada uma queda no crescimento em concentrações maiores que 150 g L<sup>-1</sup>. O inóculo foi preparado em meio contendo xilose visando adaptação da cepa. O microrganismo adaptado mostrou habilidade de crescer sem fase lag.

Neste capítulo, os resultados da inibição causada por ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural na fermentação por *Bacillus coagulans* 162 também são apresentados. Foi

possível avaliar o efeito que cada composto causou individualmente na multiplicação celular e na produção de ácido láctico. Compostos fenólicos, como o ácido cumarílico, coniferílico e sinapílico, liberados da fração de lignina não foram considerados neste estudo de inibição. A lignina insolúvel também não foi considerada.

O efeito causado por cada inibidor foi avaliado variando-se a concentração de cada um deles tendo por base a concentração encontrada após cinco etapas sucessivas de extração do bagaço explodido a vapor.

Os ensaios foram realizados em frascos agitados contendo meio de cultivo com glicose (20 g L<sup>-1</sup>) como principal fonte de carbono. O ácido acético foi testado nas concentrações de 0 a 10 g L<sup>-1</sup>, o furfural e o HMF foram testados nas concentrações de 0 a 2 g L<sup>-1</sup>. Dentro da faixa testada, o ácido acético apresentou forte ação inibitória, tanto na produção de biomassa quanto de ácido láctico. O furfural e o HMF apresentaram efeito inibitório em concentrações acima de 1,5 g L<sup>-1</sup> na produção de biomassa, mas nenhuma redução significativa no rendimento em ácido láctico.

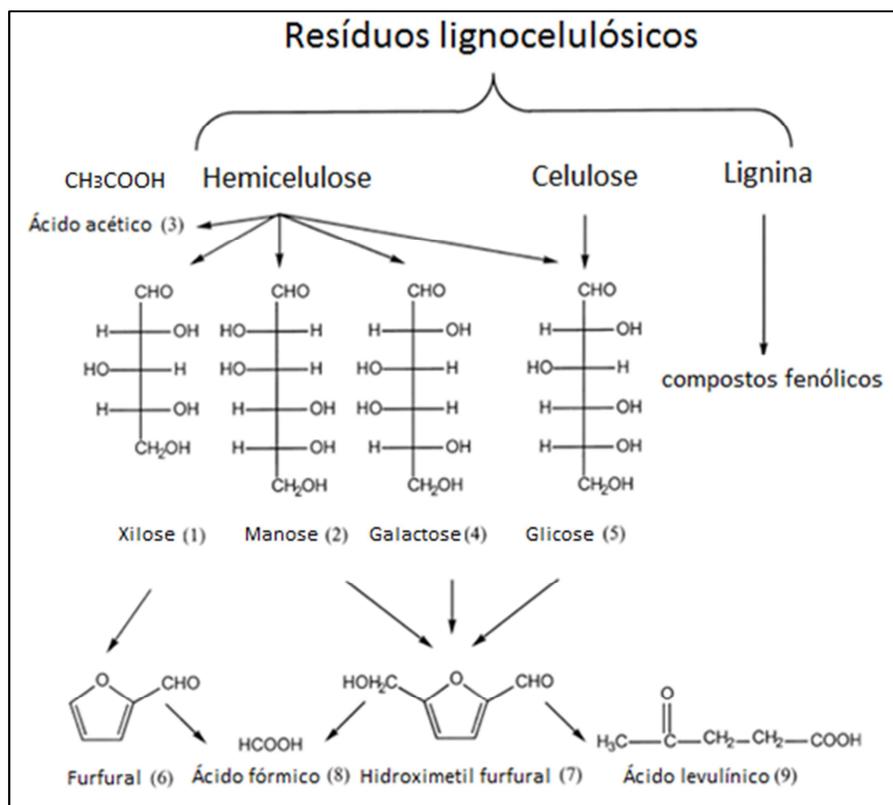
## 7.2. Introdução

Materiais lignocelulósicos são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina e incluem grama, madeira, resíduos florestais, resíduos agrícolas e sólidos urbanos.

A celulose é um polímero linear de elevada massa molar composto por unidades de  $\beta$ -1,4-D-glicose ligadas e se apresenta como um material altamente cristalino (FAN *et al.*, 1982). As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados, constituídos basicamente pelas pentoses D-xilose e L-arabinose, e as hexoses D-manose, D-glicose, D-galactose e ácidos. A estrutura ramificada da hemicelulose torna-a mais facilmente hidrolisável do que a celulose. Madeiras macias (por exemplo, abetos e pinheiros) e folhosas (por exemplo, salgueiro, faia e carvalho) diferem na estrutura e composição da hemicelulose (SAKA, 1991). A hemicelulose de madeiras macias tem uma maior proporção de unidades de manose e glicose que a hemicelulose da madeira de lei, que normalmente contém uma maior proporção de unidades de xilose. Além disso, a fração hemicelulósica é mais altamente acetilada em madeiras macias (FENGEL & WENGER, 1989).

A lignina é um polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanóide (ADLER, 1977). As ligninas são divididas em duas classes: "ligninas guaiacil" e "ligninas guaiacil-siringil", que diferem nos substituintes do esqueleto fenilpropanóide. As ligninas guaiacil possuem um grupo metoxi na posição carbono-3, enquanto as ligninas siringil possuem um grupo metoxi-3 tanto no carbono-3 quanto no carbono-5. As madeiras macias e as madeiras de lei pertencem às duas categorias respectivamente. As madeiras macias contêm geralmente mais lignina que as madeiras de lei (SAKA, 1991). A cana de açúcar possui em média 30% de celulose, 25% de hemicelulose e 20% de lignina (solúvel e insolúvel) (CHANDEL *et al.*, 2012).

Procedimentos de hidrólise que consistem no tratamento do material lignocelulósico a alta temperatura podem levar à formação e liberação de vários compostos, desejáveis e indesejáveis. As principais vias de degradação estão esquematicamente apresentadas na **Figura 38** abaixo:



**Figura 38.** Principais vias de degradação de materiais lignocelulósicos, exemplificado a partir de madeira de Abeto. Adaptado de PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL (2000).

A hemicelulose ao ser degradada libera xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose (**Figura 38**, nº 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente). A celulose é hidrolisada em glicose. Altas temperaturas e pressões favorecem a conversão da xilose em furfural (**Figura 38**, nº 6) (DUNLOP, 1948). Da mesma forma, 5-hidroximetil furfural (HMF) (**Figura 38**, nº 7) é formado a partir da degradação de hexose (ULBRICHT *et al.*, 1984). Ácido fórmico (**Figura 38**, nº 8) é formado quando furfural e HMF são decompostos (DUNLOP, 1948; ULBRICHT *et al.*, 1984). Ácido levulínico (**Figura 38**, nº 9) é formado pela degradação do HMF (ULBRICHT *et al.*, 1984). Os compostos fenólicos são gerados a partir de decomposição parcial da lignina (BARDET *et al.*, 1985; LAPIERRE *et al.*, 1983; SEARS *et al.*, 1971), mas há também relatos de sua formação durante a degradação de carboidratos (POPOFF & THEANDER, 1976; SUORTTI, 1983). No hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar obtido por explosão a vapor os compostos encontrados em maior quantidade são furfural, HMF e ácido acético (AGUILAR *et al.*, 2002).

Não há estudos sobre a inibição causada por ácido acético, furfural e HMF no crescimento de *Bacillus* sp na produção de ácido láctico. Entretanto, existem estudos que tentam explicar a inibição

causada por estes compostos em outros microrganismos como a levedura *S. cerevisiae*, por exemplo.

O mecanismo de inibição provocado pelo ácido acético é o mesmo atribuído a todos os ácidos fracos. Os ácidos são classificados como fortes ou fracos, dependendo da sua constante de dissociação,  $K_a$  (ATKINS, 1990). O  $pK_a$  é definido como o logaritmo negativo de  $K_a$  e em soluções contendo o ácido fraco em que o pH for igual ao  $pK_a$ , as concentrações entre as formas não dissociada e dissociada do ácido são iguais, e é onde, conseqüentemente, a capacidade de tamponamento do ácido é mais elevada. A concentração de ácido não dissociado é uma função do pH e do  $pK_a$ , e aumenta com o decréscimo do pH (equação de Henderson-Hasselbach (ATKINS, 1990)). Os ácidos fracos têm valores muito elevados de  $pK_a$ . Os valores de  $pK_a$ , por exemplo, a força iônica zero para os ácidos acético, fórmico, octanóico e levulínico são 4,75 (25°C), 3,75 (20°C), 4,89 (25°C) (WEAST, 1975 e 1976) e 4,66 (25°C) (SONI *et al.*, 1982), respectivamente. A concentração de ácidos não dissociados em hidrolisados lignocelulósicos é, portanto, muito sensível a pequenos desvios de pH próximos a pH 5,5.

Devido a sua capacidade de inibir o crescimento celular, os ácidos fracos são utilizados como conservantes de alimentos (BROWN & BOOTH, 1991). Ácidos orgânicos fracos não dissociados são lipossolúveis e podem difundir através da membrana plasmática. A capacidade de inibição tem sido atribuída a esta habilidade de influxo do ácido não dissociado para o interior do citosol (AXE & BAILEY, 1995; STOUTHAMER, 1979; VERDUYN *et al.*, 1990; VERDUYN *et al.*, 1992; WARTH, 1988). No citosol, a dissociação do ácido ocorre devido ao pH intracelular neutro, diminuindo o pH citosólico (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989). Assim, a concentração de ácidos não dissociados em hidrolisados lignocelulósicos é muito dependente do pH sendo este, portanto, um parâmetro importante durante a fermentação.

O pH baixo durante fermentação inibe a proliferação e a viabilidade celular também na ausência de ácidos fracos, devido ao aumento do gradiente de prótons através da membrana plasmática, o que resulta em um aumento na taxa de absorção passiva destes íons (VERDUYN *et al.*, 1990). A manutenção de um pH neutro intracelular é crucial para a viabilidade celular. Foi observado que a atividade de multiplicação celular diminui linearmente com a redução do pH intracelular (IMAI & OHONO, 1995). A faixa ótima de pH para o crescimento *B. coagulans* 5,5-6,5.

Dois mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito inibitório de ácidos fracos: desacoplamento e acúmulo intracelular de ânions (RUSSELL, 1992). De acordo com a teoria de desacoplamento, a queda do pH intracelular resultante de fluxo de entrada de ácidos fracos é neutralizada pela ação da ATPase da membrana plasmática, que bombeia prótons para fora da célula, à custa da hidrólise do ATP (STOUTHAMER, 1979; VERDUYN *et al.*, 1992). ATP adicional deve ser gerado, a fim de manter o pH intracelular, e sob condições anaeróbicas isto é conseguido por aumento da produção de lactato, à custa da formação de biomassa. Em concentrações de ácido elevadas, a capacidade de bombeamento de prótons da célula é esgotado, resultando na depleção do teor de ATP, dissipação da força motriz de prótons e acidificação do citoplasma (IMAI & OHONO, 1995). No entanto, as formas aniônicas dos ácidos acético, propiônico e fórmico são lipofóbicos e não atravessam a membrana plasmática durante o crescimento em glicose (CASAL *et al.*, 1996). A dissipação da força motriz de prótons por ácidos fracos tem sido questionada uma vez que cada molécula de ácido não dissociado conduz para a importação de apenas um próton (RUSSELL, 1992). Isto está em desacordo com desacopladores sintéticos, tais como dinitrofenol, que podem atravessar a membrana plasmática em ambas as formas, dissociada e não dissociada, provocando uma taxa de importação de prótons. Tem sido sugerido em vez disso, que a toxicidade dos ácidos fracos é devido à acumulação de ânion intracelular (REFERENCIA).

De acordo com a teoria de acúmulo de ânions, o ácido sob a forma aniônica é capturado e o ácido não dissociado irá difundir para dentro da célula até que o equilíbrio seja alcançado (ROTTENBERG, 1979). Uma vez que a concentração de equilíbrio do ácido não dissociado é uma função do pH, a extensão do acúmulo intracelular será uma função do gradiente de pH através da membrana plasmática (RUSSELL, 1992). Em pH extracelular baixo, o acúmulo intracelular de ânions atinge níveis elevados no microrganismo, pois ele mantém um pH intracelular neutro. Em meios com misturas de glicose e ácido acético em pH baixo, a razão do acúmulo de ânions foi demonstrado com aumento 10-1000 vezes quando o pH foi diminuído de 6,0 para 3,5 (CASAL *et al.*, 1996). A atividade de enzimas glicolíticas, na presença de ácido acético foi investigada, mostrando que enolase foi a enzima mais sensível, e que a inibição era devido tanto à acidificação interna quanto pela interferência directa com o ácido (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989).

Não há estudos sobre a inibição causada por furfural e HMF no crescimento de *Bacillus* sp na produção de ácido lático. Entretanto, o efeito inibitório causado por furfural e HMF foi estudado na levedura *S. cerevisiae* na produção de etanol, de onde se pode fazer algumas

observações com base em suas rotas metabólicas. O furfural pode ser metabolizado por *S. cerevisiae* aerobicamente (TAHERZADEH *et al.*, 1998), com oxigênio limitado (FIREOVED & MUTHARASAN, 1986; NAVARRO, 1994) e sob condições anaeróbicas (PALMQVIST *et al.*, 1999). Durante a fermentação a redução do furfural a álcool furfurílico ocorre com rendimentos elevados (DIAZ DE VILLEGAS *et al.*, 1992; PALMQVIST *et al.*, 1999; TAHERZADEH *et al.*, 1998; VILLA, 1992). A inibição do crescimento aeróbio de *Pichia stipitis* pelo álcool furfurílico também foi relatada (WEIGERT *et al.*, 1988), enquanto que apenas ligeira inibição do crescimento anaeróbio de *S. cerevisiae* foi detectada (PALMQVIST *et al.*, 1999). A oxidação do furfural a ácido furóico por *S. cerevisiae* ocorre principalmente sob condições aeróbicas (PALMQVIST *et al.*, 1999; TAHERZADEH *et al.*, 1998). Um metabólito identificado como um produto de reação entre piruvato e furfural foi recentemente descoberto durante a fermentação na presença de furfural (TAHERZADEH *et al.*, 1998). A taxa de redução do furfural aumentou com o aumento do tamanho do inóculo (BOYER *et al.*, 1992; CHUNG & LEE, 1984; NAVARRO, 1994), e com aumento da taxa específica de crescimento específico em cultivo contínuo (FIREOVED & MUTHARASAN, 1986) e batelada (TAHERZADEH *et al.*, 1998). A taxa de redução em fermentação anaeróbia em batelada aumentou com o aumento da concentração de furfural até aproximadamente 84 mmol g<sup>-1</sup>, diminuindo logo em seguida, devido provavelmente a morte celular em concentrações elevadas de furfural (PALMQVIST *et al.*, 1999).

Há estudos com *S. cerevisiae* que relatam que o furfural reduz sua taxa de crescimento específico (AZHAR *et al.*, 1981; BOYER *et al.*, 1992; NAVARRO, 1994), o rendimento de massa celular em ATP (PALMQVIST *et al.*, 1999) e a produtividade volumétrica (AZHAR *et al.*, 1981; NAVARRO, 1994). O crescimento microbiano mostrou-se mais sensível ao furfural que a produção de etanol (PALMQVIST *et al.*, 1999).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) é NADH-dependente e acredita-se que seja responsável pela redução do furfural em leveduras (DIAZ DE VILLEGAS *et al.*, 1992; TAHERZADEH *et al.*, 1998; WEIGERT *et al.*, 1988). Em condições anaeróbicas, o glicerol é normalmente produzido para regenerar NADH em excesso formado na biossíntese (OURA, 1977). A produção de glicerol mostrou-se significativamente inibida durante a redução furfural, sugerindo que a redução de furfural regenera NAD<sup>+</sup> (PALMQVIST *et al.*, 1999). Pelo fato de menos quantidade de carbono ter sido consumido para a produção de glicerol na presença de furfural, um aumento no rendimento de etanol na presença de 29 mmol l<sup>-1</sup> deste inibidor foi observado quando comparado com a fermentação em sua ausência. Elevadas concentrações de acetaldeído foram

excretadas no início da fermentação, sugerindo uma diminuição na concentração de NADH na célula durante redução do furfural (PALMQVIST *et al.*, 1999). Inibição de enzimas glicolíticas pelo furfural *in vitro* tem sido relatada (BANERJEE *et al.*, 1981), e inibição direta de ADH pode ter contribuído para a excreção de acetaldeído. Acúmulo intracelular de acetaldeído tem sido sugerido como a razão pela presença de fase lag no crescimento celular em presença de furfural (PALMQVIST *et al.*, 1999).

Um modelo matemático descrevendo as taxas específicas de crescimento, consumo de glicose, produção de etanol, formação de glicerol e redução do furfural em fermentação em batelada foi desenvolvido baseado nas seguintes premissas: (i) a redução de furfural a álcool furfurílico por NADH desidrogenases dependentes possuía prioridade maior do que a redução de dihidroxiacetona-fosfato a glicerol, e (ii) furfural causaria inativação de replicação celular (PALMQVIST *et al.*, 1999).

Há relatos que propõem que HMF é convertido a uma taxa inferior quando comparado ao furfural, o que é creditado à baixa permeabilidade de membrana, provocando uma maior fase lag durante crescimento microbiano (LARSSON *et al.*, 1998). O principal produto de conversão 5-hidroxiacetona-fosfato a glicerol, e (ii) furfural causaria inativação de replicação celular (PALMQVIST *et al.*, 1999). O principal produto de conversão 5-hidroxiacetona-fosfato a glicerol, e (ii) furfural causaria inativação de replicação celular (PALMQVIST *et al.*, 1999), sugerindo mecanismos similares para inibição por HMF e furfural.

A adaptação de microrganismos em presença de inibidores tem sido descrito na literatura com o objetivo de levar ao aumento do crescimento e produtividade volumétrica. A adaptação pode ser devido à síntese de novas enzimas ou co-enzimas que reduzem o furfural (BOYER *et al.*, 1992). Há relatos de que a atividade de ADH em fermentação anaeróbia para produção de etanol apresentou um aumento de 78% após 48 h de fermentação com uma concentração inicial de furfural 2 g L<sup>-1</sup> (BANERJEE *et al.*, 1981).

Dentre os principais objetivos deste trabalho pode-se citar a verificação do efeito de diferentes concentrações de xilose, ácido acético, furfural e HMF no crescimento de *Bacillus coagulans* sp. e na produção de ácido láctico. Além disso, foi possível obter a faixa de tolerância à presença de inibidores e se esta faixa de concentração coincide em alguma extensão com aquela de compostos inibidores naturalmente presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. Finalmente, pode-se verificar a necessidade de se realizar a detoxificação do meio de cultivo onde o hidrolisado hemicelulósico é utilizado com fonte de açúcares.

### **7.3. Materiais e métodos**

#### **7.3.1. Microrganismo**

*Bacillus coagulans* 162 foi obtido da coleção particular do ATB - Leibnitz Instituto de Engenharia Agrícola (Potsdam, Alemanha). A bactéria foi cultivada em MRS ágar padrão (DE MAN *et al.*, 1960) e conservada a +8°C.

#### **7.3.2. Meio de cultivo**

O meio de cultivo utilizado no experimento foi composto por extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>); sulfato de magnésio (0,1 g L<sup>-1</sup>) e sulfato de manganês (0,05 g L<sup>-1</sup>).

Os ensaios de inibição por xilose foram realizados utilizando diferentes concentrações do açúcar: de 20 a 200 g L<sup>-1</sup>. Uma solução estoque contendo 400 g L<sup>-1</sup> de xilose foi preparada com água destilada e esterilizada a 118°C por 15 min. A solução de açúcar foi assepticamente adicionada aos frascos Erlenmeyer contendo a solução nutriente. O volume final foi corrigido com água destilada.

#### **7.3.3. Inóculo**

Uma alçada da cultura, cultivada em meio inclinado, foi inoculada em 100 mL de meio MRS modificado contendo (g L<sup>-1</sup>): glicose (20); extrato de levedura (15); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2); MgSO<sub>4</sub> (0,1) e MnSO<sub>4</sub> (0,05). O frasco Erlenmeyer (250 mL) foi agitado a 150 rpm por 18 h a 52°C.

### 7.3.4. Experimentos

#### 7.3.4.1. Inibição por xilose

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 18 mL de meio de cultivo. Um volume de 2 mL de inóculo foi adicionado aos frascos de Erlenmeyers. A fermentação foi realizada em agitador orbital a 150 rpm, temperatura de 52°C e pH inicial igual a 6,0. A **Tabela 19** descreve a concentração de xilose nos ensaios.

**Tabela 19.** Concentração de xilose no meio de cultivo MRS modificado para fermentação de *B. coagulans* 162 (150rpm/52°C/48h).

<i>ensaio</i>	<i>Xilose</i> (g L <sup>-1</sup> )
1	0
2	20
3	40
4	60
5	80
6	100
7	125
8	150
9	175
10	200

Foram feitas análises para determinação de glicose, xilose, ácido láctico, ácido acético e contagem microbiana. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 7.3.4.2. Inibição por furfural, HMF e ácido acético

A frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 18 mL de meio de cultivo MRS modificado (glicose 20 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 15 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,01 g L<sup>-1</sup> e MnSO<sub>4</sub> 0,05 g L<sup>-1</sup>) foram acrescentados os compostos furfural, HMF e ácido acético nas concentrações teste de acordo com a **Tabela 20**, abaixo:

**Tabela 20.** Concentração dos compostos furfural, HMF e ácido acético no meio de cultivo MRS modificado contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose para fermentação de *B. coagulans* 162 (150rpm/52°C/48h).

ensaio	Furfural (g L <sup>-1</sup> )	HMF (g L <sup>-1</sup> )	Ácido acético (g L <sup>-1</sup> )
1	-	-	-
2	0,25	-	-
3	0,50	-	-
4	1,00	-	-
5	1,50	-	-
6	2,00	-	-
7	-	0,25	-
8	-	0,50	-
9	-	1,00	-
10	-	1,50	-
11	-	2,00	-
12	-	-	2
13	-	-	4
14	-	-	6
15	-	-	8
16	-	-	10

Os sais nutrientes, a glicose e os compostos testados foram esterilizados separadamente para evitar possível geração de outros compostos inibidores via reações não enzimáticas. Alíquotas de 2 mL de inóculo preparado de acordo com o item 8.2,2 foram adicionadas aos frascos erlenmeyer contendo o meio de cultivo pronto.

Foram feitas análises para determinação de glicose, ácido láctico, ácido acético e contagem microbiana. O experimento foi realizado em triplicata.

### **7.3.5. Fermentação**

Os frascos inoculados foram agitados a 150 rpm em agitador orbital por 48 h a 52°C. A concentração celular inicial nos meios de fermentação foi padronizada em 0,3 g L<sup>-1</sup> (em peso seco).

### **7.3.6. Métodos analíticos**

Amostras do meio fermentado foram centrifugadas 4500rpm/10min/10°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore), convenientemente diluído e levado para análise em cromatógrafo. O decantado foi utilizado para determinação de biomassa. Amostragem foi feita em triplicata.

#### **7.3.6.1. Determinação de glicose**

Glicose foi determinada conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.1.

#### **7.3.6.2. Determinação de xilose**

Xilose foi determinada de acordo com metodologia descrita no item 6.2.2.2.1.

#### **7.3.6.3. Determinação de ácido lático e ácido acético**

Ácidos lático e acético foram determinados conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.2.

#### **7.3.6.4. Determinação de furfural e HMF**

Furfural e HMF foram determinados conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.3.

#### **7.3.6.5. Biomassa e contagem microbiana**

A biomassa (ou densidade celular) foi obtida indiretamente mediante curva padrão utilizando cultura celular liofilizada. Células de *Bacillus coagulans* 162 foram cultivadas em meio MRS<sub>XIL</sub> (descrito no item 3.2.3.2) composto por 20 g L<sup>-1</sup> de xilose por 24 h (10<sup>7</sup> células iniciais por mL). O meio de cultivo foi centrifugado a 4 500 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em igual volume com água destilada. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes. As células decantadas foram armazenadas a -40°C durante 24 h previamente ao processo de liofilização. As células congeladas foram liofilizadas -30°C e 61 µHg em processo que durou 24 h (equipamento L101, Mod. Liotop, Fab. Liobras, Brasil). A biomassa seca foi pesada e apropriadamente diluída em água destilada para obtenção da curva padrão. A leitura da densidade ótica foi feita em espectrofotômetro a 600 nm na faixa de 0,1 – 0,6 unidades de absorvância usando água destilada como referência de calibração.

O número de células totais foi obtido por câmaras de NEUBAUER. O número de células viáveis foi obtido por contagem em placas de Petri contendo MRS ágar padrão. Amostra do meio fermentado foi convenientemente diluída e espalhada sob a superfície solidificada do meio de cultivo. As placas de Petri foram incubadas à temperatura ótima de crescimento (Tabela 2) por 24 h.

#### **7.3.6.6. Estatística**

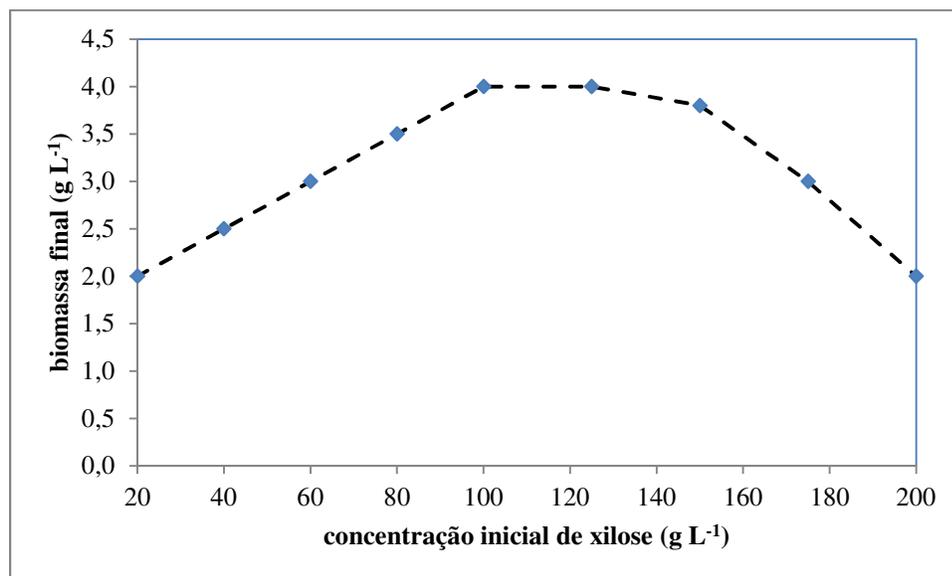
Análises estatísticas foram realizadas utilizando Teste Tukei para obtenção das diferenças significativas. Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliados a 95% de confiança.

## 7.4. Resultados e discussão

### 7.4.1. Inibição por xilose

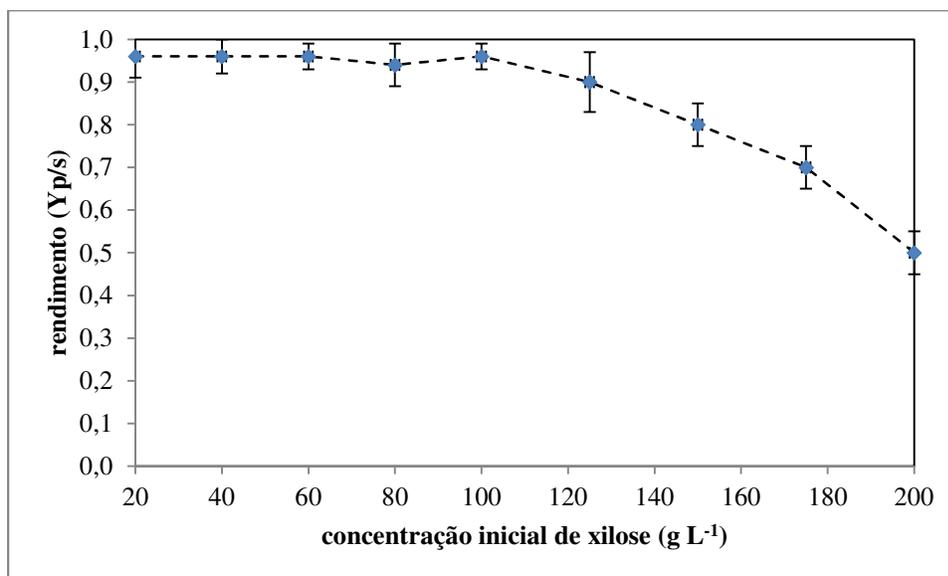
A produção de biomassa foi inibida em concentrações de xilose acima de  $150 \text{ g L}^{-1}$  (**Figura 38**). A partir deste valor, a biomassa final obtida na fermentação de *B. coagulans* 162 decresceu. No presente estudo, a faixa de concentração estudada não abrangeu o ponto em que a inibição foi máxima, onde nenhuma célula foi produzida. Contudo, como a produção do ácido lático é associada e não associada ao crescimento, a multiplicação celular interfere diretamente na quantidade de ácido lático produzido, mas não define a produtividade do processo. A fase estacionária é também importante e o número de células viáveis concomitantemente. Na realidade, quanto menos biomassa for produzida para se alcançar uma mesma produtividade, maior será a eficiência do sistema.

A concentração celular máxima se deu em meio contendo  $125 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. A partir de  $150 \text{ g L}^{-1}$  de xilose a produção de biomassa foi inibida sensivelmente (**Figura 39**).



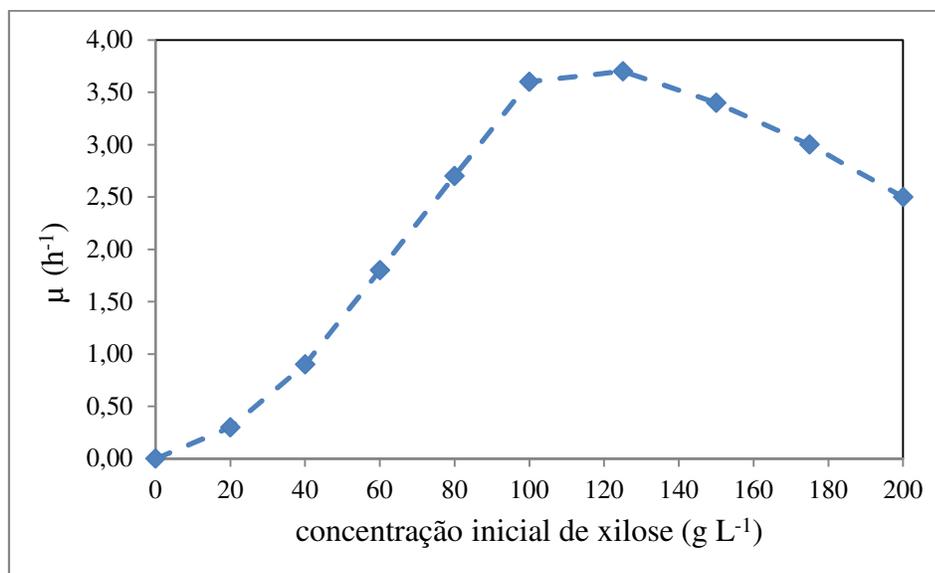
**Figura 39.** Biomassa final obtida durante fermentação de *B. coagulans* 162 em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de xilose durante estudo de inibição por substrato.

O rendimento de ácido lático permaneceu constante e igual a 0,90 em meios de cultivo com concentrações de xilose de até  $125 \text{ g L}^{-1}$ . A partir de  $150 \text{ g L}^{-1}$  o rendimento diminuiu (**Figura 40**).



**Figura 40.** Rendimento de ácido láctico obtido durante fermentação de *B. coagulans* 162 em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de xilose durante estudo de inibição por substrato.

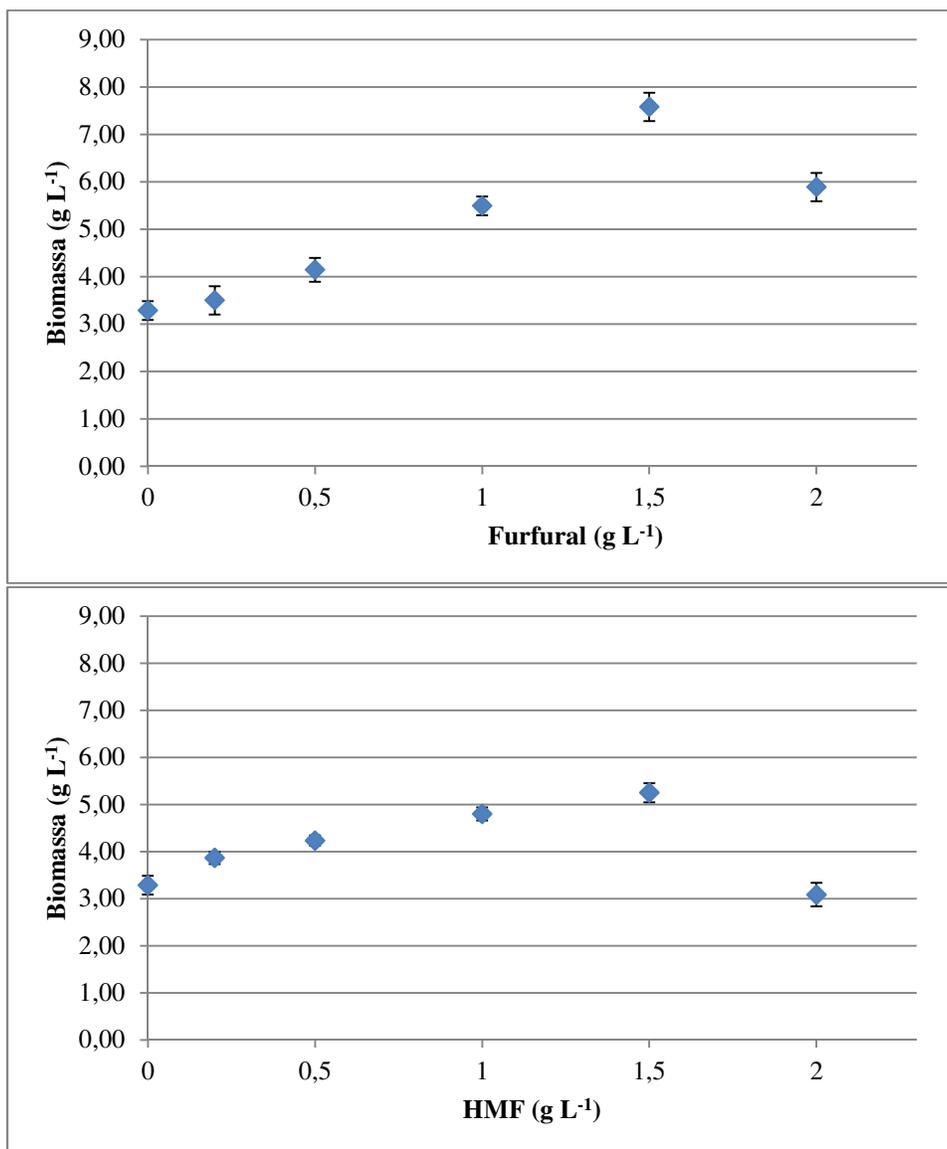
Segundo a velocidade específica de crescimento é possível utilizar concentrações iniciais de xilose de até 125 g L<sup>-1</sup>, a partir de 150 g L<sup>-1</sup> há importante repressão no crescimento, que continua a diminuir a partir deste ponto (**Figura 41**).



**Figura 41.** Velocidades específicas de crescimento obtidas durante fermentação de *B. coagulans* 162 em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de xilose durante estudo de inibição por substrato.

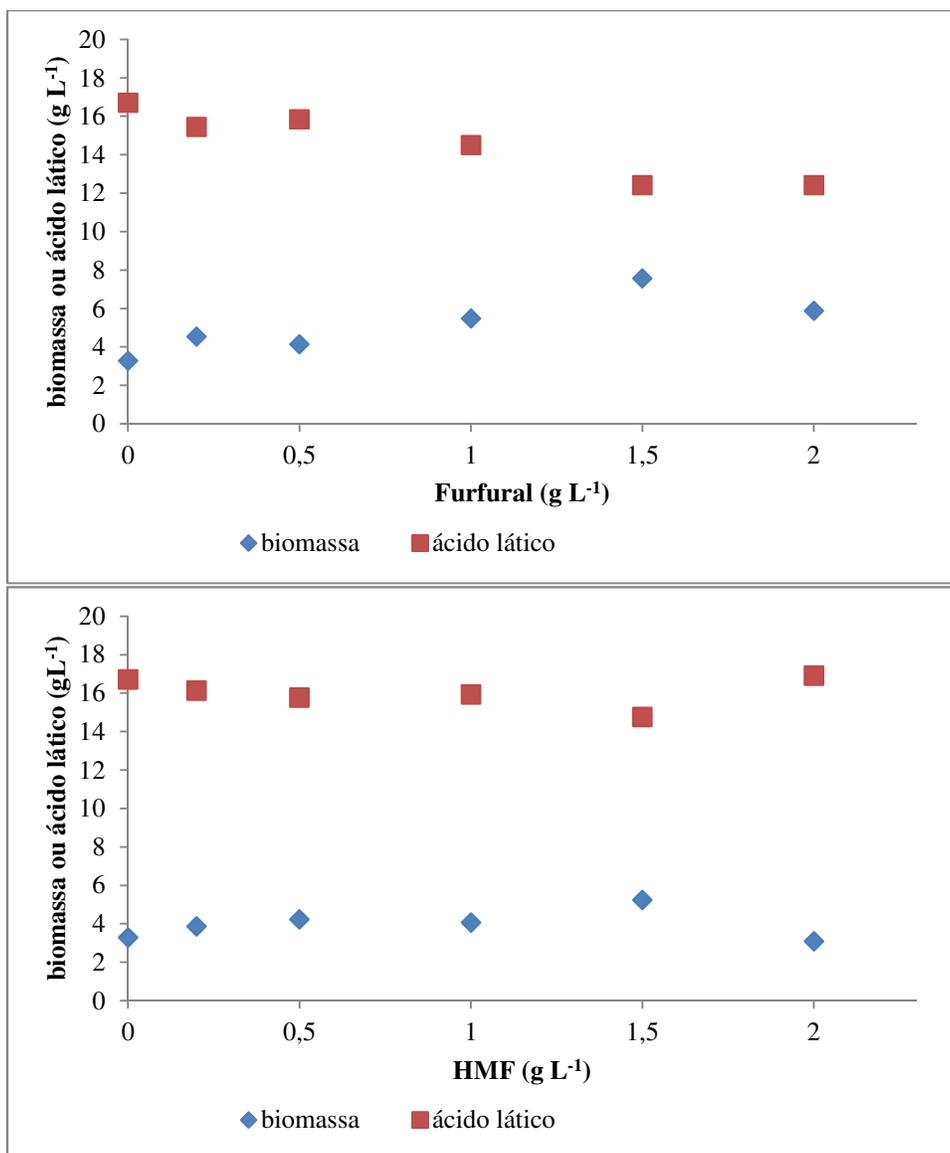
#### 7.4.2. Inibição por furfural, HMF e ácido acético

Na fermentação de *Bacillus coagulans* 162 a concentração celular inicial foi de 0,3 g de biomassa/l em meio de cultivo contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose como fonte principal de carbono. Os resultados da produção de biomassa em meios de cultivo contendo furfural ou HMF podem ser vistos nos gráficos abaixo (**Figura 42**):



**Figura 42.** Biomassa obtida em fermentação de *B. coagulans* 162 em meios de cultivo contendo furfural ou HMF após 48h a 150rpm e 52°C.

É interessante observar que a concentração de biomassa aumenta com o aumento da concentração de furfural até  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  atingindo máximo de  $7,58 \text{ g}$  de biomassa por litro. O mesmo se observa com o HMF para a mesma concentração atingindo  $5,25 \text{ g}$  de biomassa por litro de meio fermentado. Estas concentrações são altas se compararmos estes resultados com o meio de cultivo sem qualquer inibidor, o qual obteve concentração de biomassa igual a  $3,29 \text{ g L}^{-1}$  ao final da fermentação. Para ambos compostos inibidores, a concentração de  $2 \text{ g L}^{-1}$  mostrou uma queda na produção de biomassa. Do ponto de vista de produtividade em ácido láctico, não é interessante que se obtenha maior concentração de biomassa, uma vez que a fonte de carbono que poderia estar sendo utilizada para produzi-lo estará desviada para a multiplicação celular. Um sistema com estas concentrações de inibidores somente se justificaria se o processo de detoxificação do meio de cultivo fosse tão caro que sobrepujasse a perda de açúcar que está implicado. Entretanto uma análise unilateral, que considera apenas a produção de biomassa pode ser equivocada. O rendimento em ácido láctico e a produtividade volumétrica do sistema se fazem necessários para se avaliar todo o sistema.

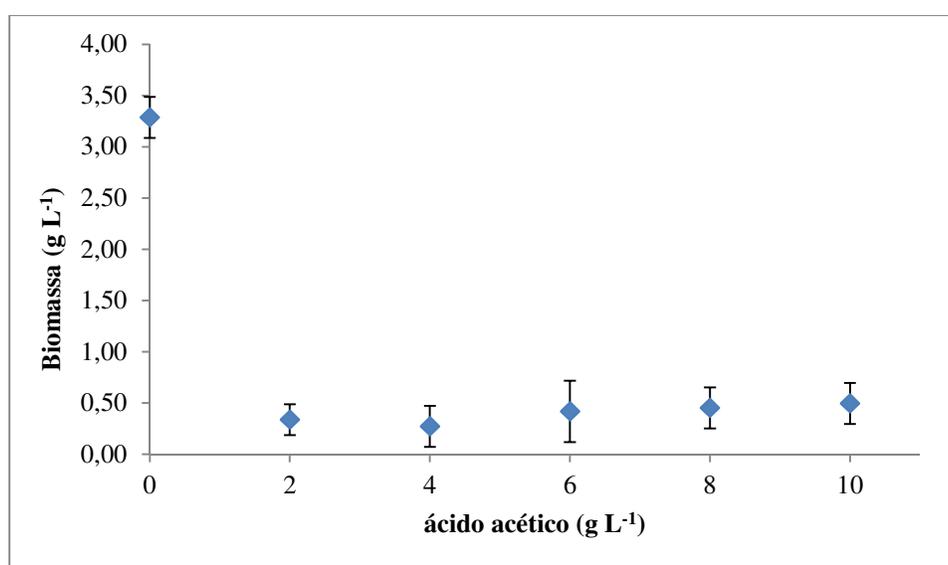


**Figura 43.** Biomassa e ácido láctico obtidos em fermentação de *B. coagulans* 162 em meios de cultivo contendo furfural ou HMF após 48h a 150rpm e 52°C.

Com relação à produção de ácido láctico pode-se verificar que ela não é prejudicada pela presença dos inibidores furfural e HMF dentro da faixa estudada. Apesar de a produção de biomassa ter sido afetada, a produção de ácido láctico foi estatisticamente igual em todas as concentrações consideradas para HMF. Este fato pode ter ocorrido devido ao fato de a produção de ácido láctico ocorrer tanto na fase de crescimento celular quanto na fase estacionária, caracterizando um comportamento associado e não associado. No estudo de furfural a produção de ácido láctico foi prejudicada apesar do aumento da concentração de biomassa.

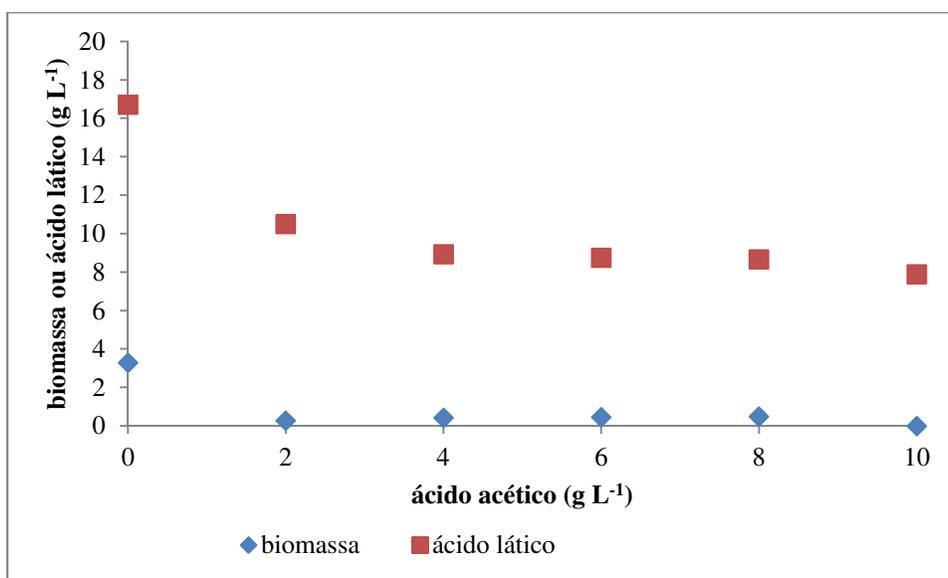
Nas análises de glicose residual foi verificado que na fermentação contendo HMF todo o açúcar foi consumido, mas que nos estudos com furfural, um total de  $1,69 \text{ g L}^{-1}$  de glicose residual foi obtido no ensaio contendo  $2 \text{ g L}^{-1}$  deste composto, mesmo após 48h de fermentação.

Com relação ao ácido acético, concentrações acima de  $2 \text{ g L}^{-1}$  inibiram fortemente a produção de biomassa. O ácido acético permeia a membrana celular do microrganismo causando desequilíbrio de pH no interior celular comprometendo suas funções vitais. Considerando que a concentração de biomassa no tempo zero de fermentação foi de aproximadamente  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ , pode-se dizer que dentro da faixa de concentração de ácido acético estudada não houve crescimento celular.



**Figura 44.** Biomassa obtida em fermentação de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo contendo ácido acético após 48h a 150rpm e 52°C. Análise estatística com 95% de confiança.

Houve produção de ácido lático, mas aproximadamente 50% de toda a glicose presente inicialmente no meio permaneceram até o fim do processo, em todas as concentrações de ácido acético testadas, o que comprometeu tanto o rendimento quanto a produtividade.



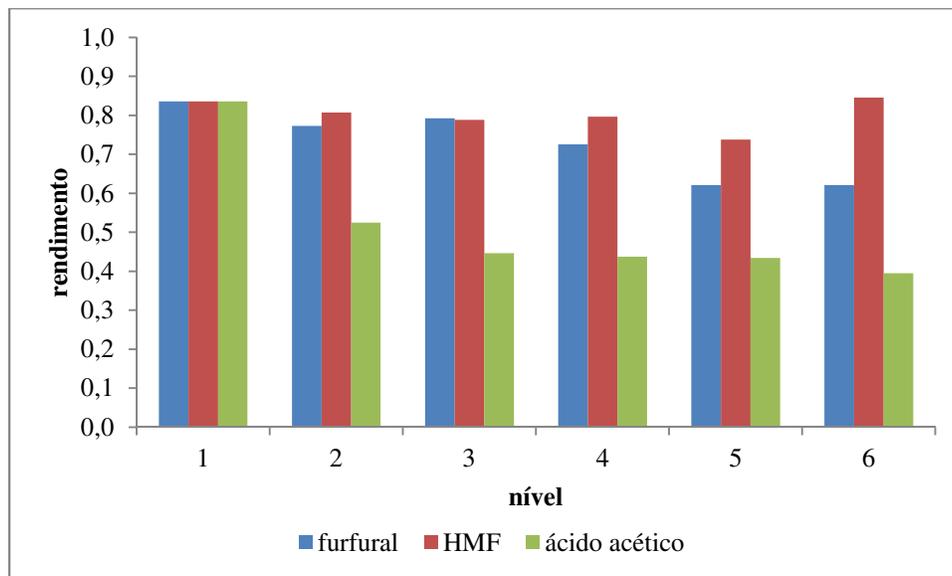
**Figura 45.** Biomassa e ácido láctico obtidos na fermentação de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo contendo ácido acético após 48h a 150rpm e 52°C.

Organizando as concentrações de inibidores em nível como observado na **Tabela 21** abaixo, pode-se obter um gráfico (**Figura 46**) que compara o rendimento de cada um dos ensaios.

**Tabela 21.** Níveis experimentais utilizados nos testes de inibição causado por furfural, HMF e ácido acético no cultivo de *B. coagulans* 162.

nível	Furfural (g L <sup>-1</sup> )	HMF (g L <sup>-1</sup> )	Ácido acético (g L <sup>-1</sup> )
1	0	0	0
2	0,2	0,2	2
3	0,5	0,5	4
4	1,0	1,0	6
5	1,5	1,5	8
6	2,0	2,0	10

No nível 1 onde não há inibidores, o rendimento é igual a 0,84. A partir deste ponto (níveis 2, 3, 4, 5 e 6) o composto que demonstrou maior influência na produção de ácido láctico foi o ácido acético. O HMF, apesar de mostrar uma influência na produção de biomassa e produção de ácido láctico, não afetou significativamente o rendimento. É possível que o HMF e o furfural tenham tido influência no aumento da fase lag durante crescimento microbiano, entretanto estes valores não foram possíveis de serem obtidos neste estudo.



**Figura 46.** Rendimento obtido nos experimentos de inibição por furfural, HMF e ácido acético na fermentação de *B. coagulans* 162 em meio de cultivo contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose após 48h a 150rpm e 52°C.

Alguns trabalhos discorrem sobre a habilidade de linhagens *Bacillus coagulans* de crescerem em presença de inibidores como ácido acético, que são compostos naturalmente encontrados em extratos hemicelulósicos (Walton *et al.* 2010). Segundo estes autores, a fermentação nestes meio pode requerer um pouco mais de tempo, com uma fase lag maior que naquele meio onde não há compostos inibidores, porém o rendimento em ácido lático não é afetado por isso.

Nesse trabalho foi utilizado experimento em agitador orbital onde o pH não é controlado. Em fermentador, onde há adição de base para manutenção do pH nas condições ótimas de crescimento do microrganismo, espera-se que o ácido acético tenha menor influência no crescimento microbiano.

## 7.5. Conclusão

Nos estudos de inibição por xilose, verificou-se que a produção de biomassa foi inibida em concentrações acima de  $150 \text{ g L}^{-1}$ , porém a concentração celular máxima se deu em meio contendo  $125 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. O rendimento de ácido láctico permaneceu constante e igual a 0,90 em meios de cultivo com concentrações de xilose de até  $125 \text{ g L}^{-1}$ , diminuindo a partir de  $150 \text{ g L}^{-1}$ .

Nos estudos de inibição por furfural e HMF, a concentração de biomassa aumentou nos ensaios contendo  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de Furfural ou HMF, obtendo concentrações de biomassa iguais a  $7,58$  e  $5,25 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, em relação à produção de ácido láctico pode-se verificar que ela não é prejudicada pela presença destes compostos dentro da faixa estudada e o rendimento se situa em torno de 0,84.

Ácido acético em concentrações superiores a  $2 \text{ g L}^{-1}$  foram inibitórias ao crescimento celular de *Bacillus coagulans* 162 em frascos agitados. Foi produzido ácido láctico, mas aproximadamente 50% de todo o açúcar presente no meio originalmente, remanesceu após 48h de fermentação. O rendimento em meio contendo inibidor neste estudo se situou entre 0,52 (2 g de ácido acético por litro) e 0,39 (10 g de ácido acético por litro).

Comparando os resultados obtidos na inibição de *B. coagulans* 162, pode-se constatar que uma etapa de detoxificação previamente à fermentação seria interessante no intuito de se aumentar a eficiência no processo.

## 8. FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA EXPLODIDO A VAPOR E DE MEIO SIMULADO POR *Bacillus coagulans* 162

### UM ESTUDO COMPARATIVO

---

#### 8.1. Resumo

A bactéria *Bacillus coagulans* 162 foi fermentada em meio de cultivo contendo hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor utilizando xilose e glicose como principais fontes de carbono. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido pela extração sucessiva dos sólidos solúveis contidos no bagaço pré-tratado por explosão a vapor em cinco etapas. O experimento foi realizado em três meios de cultivo: 1) Meio MRS<sub>1</sub> ou Controle (meio MRS modificado sintético contendo xilose e glicose sem inibidores); 2) Meio MRS<sub>2</sub> (meio MRS modificado sintético contendo xilose, glicose e inibidores) e 3) Meio MRS<sub>3</sub> (meio MRS modificado contendo Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado). As fermentações foram realizadas em biorreator (2 L) com controle automático de pH e temperatura. O sistema foi conduzido em regime de batelada alimentada e interrompido quando os açúcares xilose e glicose haviam se exaurido. As fermentações em paralelo permitiram observar o potencial de conversão dos açúcares no hidrolisado hemicelulósico e compará-lo àquele em meio sintético. Em todos os experimentos todo o açúcar foi consumido e o rendimento ( $Y_{p/s}$ ) se situou em torno de 0,94. No meio de cultivo contendo inibidores, o processo se verificou mais lento, finalizando-se em 17h, enquanto a fermentação nos demais meios terminou em 12 h.

## **8.2. Materiais e métodos**

### **8.2.1. Microrganismo**

*Bacillus coagulans* 162 foi gentilmente cedido pelo Departamento de biotecnologia do Instituto Leibnitz de Engenharia Agrícola – ATB (Potsdam, Alemanha). A bactéria foi cultivada em tubos de ensaio inclinados contendo MRS ágar padrão constituído por glicose (20 g L<sup>-1</sup>), peptona de caseína (10 g L<sup>-1</sup>), extrato de carne (8 g L<sup>-1</sup>), acetado de sódio (5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (4 g L<sup>-1</sup>), fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>), citrato de amônio dibásico (2 g L<sup>-1</sup>), tween 80 (1 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,2 g L<sup>-1</sup>) e sulfato de manganês (0,04 g L<sup>-1</sup>). Os tubos foram incubados a 52°C por 24 h, recobertos por uma camada de vaselina líquida estéril e conservados à temperatura de +8°C.

### **8.2.2. Preparo do hidrolisado hemicelulósico detoxificado**

O hidrolisado hemicelulósico foi preparado através de extração sucessiva dos sólidos solúveis contidos no bagaço explodido a vapor com água destilada. A uma amostra de 100 g de bagaço (50% de umidade) foram acrescentados 400 mL de água destilada (mistura de 10% em peso seco). A mistura foi agitada a 300 rpm (agitador axial) por 30 min à temperatura ambiente e filtrada em papel Whatman n°4. O resíduo sólido retido no filtro foi prensado manualmente e toda a fração líquida foi reutilizada em posterior extração com nova massa de bagaço. Este processo foi realizado cinco vezes. Amostras de 1 mL foram retiradas em cada etapa para quantificação dos açúcares e inibidores extraídos. A fração líquida obtida ao final das cinco extrações sucessivas foi denominada Hidrolisado Hemicelulósico (HH).

A detoxificação do HH foi realizada utilizando-se carvão ativado, com tamanho de partícula de 1-2mm (SYNTH, Brazil). Uma concentração de 5% (base seca) de carvão ativado em relação ao peso seco do bagaço foi utilizada. A mistura foi realizada em Erlenmeyers de 500 mL colocados em agitador orbital (SHEL LAB, USA). O processo de detoxificação ocorreu a 250 rpm e temperatura ambiente por 2 h. A mistura foi filtrada (papel WHATMAN n° 4) e o filtrado denominado Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado (HHD). Testes preliminares foram realizados para determinar a eficiência do uso do carvão.

### **8.2.3. Meios de cultivo**

Foram testados três meios de cultivo: (1) MRS<sub>1</sub> ou Controle, meio sintético, onde não há quaisquer inibidores, servindo como referência para fermentação em condições ideais; (2) Meio MRS<sub>2</sub>, meio sintético contendo inibidores nas mesmas concentrações encontradas no Hidrolisado

Hemicelulósico (HH) e (3) Meio MRS<sub>3</sub>, meio contendo Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado (HHD). A **Tabela 18** ilustra a concentração dos principais componentes em cada meio.

**Tabela 22.** Meios de cultivo utilizados no teste de fermentação contendo hidrolisado hemicelulósico do bagaço explodido a vapor preparado de acordo com Venus (2006). Os açúcares do meio de cultivo Sintético foram adicionados. Os açúcares dos meios de cultivo contendo hidrolisados foram provenientes da fração líquida extraída do bagaço.

	Meio de cultivo 1: Controle (g L <sup>-1</sup> )	Meio de cultivo 2: Sintético com inibidores (g L <sup>-1</sup> )	Meio de cultivo 3: Hidrolisado Detoxificado (g L <sup>-1</sup> )
Glicose	2,45	2,45	2,30
Xilose	8,05	8,05	7,99
Extrato de levedura	15	15	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2	2
MgSO <sub>4</sub>	0,1	0,1	0,1
MnSO <sub>4</sub>	0,05	0,05	0,05
Furfural	0	2,42	0,08
HMF	0	1,53	0,13
Ácido acético	0	9,60	5,17

#### 8.2.4. Inóculo

Para produção do inóculo, uma alçada de células jovens (24 h) de *B. coagulans* 162 foi adicionada a 80 mL de meio de cultivo constituído por extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>); fosfato de potássio monobásico (2 g L<sup>-1</sup>); sulfato de magnésio (0,1 g L<sup>-1</sup>); sulfato de manganês (0,05 g L<sup>-1</sup>); glicose (2,45 g L<sup>-1</sup>) e xilose (20 g L<sup>-1</sup>).

Os frascos inoculados foram incubados a 52°C, agitados a 150 rpm por 24 h. Nestas condições, o inóculo atingiu uma concentração de 10<sup>9</sup> células viáveis por mL (aproximadamente 3 g L<sup>-1</sup>).

#### 8.2.5. Fermentação

No preparo do meio de cultivo, uma solução contendo os sais e nutrientes concentrada foi esterilizada separadamente para evitar reações de escurecimento não enzimático quando em

contato com os açúcares. Esta solução concentrada foi misturada ao hidrolisado estéril na proporção de 1:3.

O inóculo (80 mL) foi adicionado ao reator contendo 720 mL de meio de cultivo esterilizado (121°C/30min). O sistema foi operado em regime de batelada alimentada. Além do volume inicial de 800 mL o sistema foi alimentado com três pulsos de 400 mL de meio de cultivo estéril. A concentração inicial de células viáveis no biorreator foi de  $10^9$  unidades por mL ( $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ).

A fermentação foi realizada em bioreactor de 2 L, Modelo BIOFLO/CELLIGEN® 115, Marca Newbrunswick, USA. O pH 6,0 foi mantido pela adição de NaOH 20%, monitorado pelo software Biocommand . O meio de fermentação foi agitado a 150 rpm e a temperatura mantida em 52°C. Amostras de 2 mL foram retiradas a cada 2 h para determinação de biomassa, contagem de células viáveis e totais e para determinação de ácido lático, ácido acético, xilose e glicose.

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata.

## **8.2.6. Métodos analíticos**

### **8.2.6.1. Determinação de glicose e xilose**

Glicose e xilose foram determinadas conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.1.

### **8.2.6.2. Determinação de ácido lático e ácido acético**

Ácidos lático e acético foram determinados conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.2.

### **8.2.6.3. Determinação de furfural e hidroximetil furfural**

Furfural e HMF foram determinados conforme metodologia descrita no item 6.2.2.2.3.

### **8.2.6.4. Determinação de biomassa**

A biomassa foi determinada conforme metodologia descrita no item 7.2.4.4.

### **8.2.6.5. Determinação de microrganismos totais**

A contagem de microrganismos totais foi realizada utilizando-se câmaras de Neubauer.

### **8.2.6.6. Análise estatística**

Análises estatísticas foram realizadas utilizando Teste Tukey para obtenção das diferenças significativas. Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliados a 95% de confiança.

### 8.3. Resultados e discussão

#### 8.3.1. Preparo do hidrolisado em cinco etapas de extração

Após cinco lavagens sucessivas do bagaço da cana de açúcar não se verificou significativo aumento do teor de açúcares que justificasse o emprego de mais etapas. Entretanto, o teor de ácido acético aumentou linearmente com o aumento do número de extrações. Os resultados podem ser observados na **Tabela 19**.

**Tabela 23.** Obtenção de sólidos solúveis extraídos do bagaço da cana de açúcar com água destilada. Concentração de bagaço igual a 10% (em base seca).

<i>Etapa de extração</i>	<b>Xilose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glicose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Arabinose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Furfural (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>HMF (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ácido acético (g L<sup>-1</sup>)</b>
<i>1<sup>a</sup></i>	4,67	1,28	0,35	0,54	0,23	1,89
<i>2<sup>a</sup></i>	5,43	2,31	0,83	1,01	0,50	3,99
<i>3<sup>a</sup></i>	8,05	2,54	1,21	1,70	0,80	6,70
<i>4<sup>a</sup></i>	9,74	2,89	1,55	2,47	1,50	8,45
<i>5<sup>a</sup></i>	10,73	3,27	1,78	3,22	2,04	12,80

A maior concentração de furfural pode ser creditada à presença de maior quantidade de xilose livre no meio, tendo esta sido convertida durante processo de hidrólise térmica por explosão a vapor. Considerando todo o furfural proveniente da xilose pode-se estimar uma perda de 23% deste açúcar extraído. Analogamente, em relação ao HMF e à glicose, observa-se uma perda de 38% do potencial de hexose extraído durante explosão a vapor.

#### 8.3.2. Detoxificação do hidrolisado

A composição do hidrolisado antes e posteriormente à detoxificação pode ser vista na **Tabela 24**, A detoxificação mostrou-se eficiente principalmente na redução do HMF e do furfural.

**Tabela 24.** Quantidades médias de inibidores encontradas no hidrolisado do bagaço explodido a vapor antes e após detoxificação com carvão ativado (5% em relação à massa seca de bagaço)

	<b>HMF (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência remoção</b>	<b>Furfural (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência remoção</b>	<b>Ácido acético (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência remoção</b>
<i>HH antes da adição do carvão ativado</i>	2,04	<b>92%</b>	3,22	<b>97%</b>	12,80	<b>47%</b>
<i>HH detoxificado</i>	0,17		0,10		6,89	

Após cinco etapas de lavagem, a concentração de monossacarídeos, definido pela soma das concentrações de glicose, xilose e arabinose encontradas na água de lavagem, foi de aproximadamente 16 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 25.** Quantidades médias de monossacarídeos livres (xilose e glicose) encontradas no hidrolisado do bagaço explodido a vapor antes e após uso de carvão ativado (5% em relação à massa seca de bagaço)

	Xilose (g L <sup>-1</sup> )	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Açúcares totais (g L <sup>-1</sup> )	Perda de açúcares totais	pH
<i>HH antes da adição do carvão ativado</i>	10,73	3,27	14,00	<b>1,85%</b>	2,73
<i>HH detoxificado</i>	10,66	3,06	13,74		3,05

Negligenciando a fração de arabinose, por ser, neste experimento, não relevante, o estudo do uso de carvão ativado mostrou que a quantidade de monossacarídeos livres totais não foi grandemente afetada, acarretando em perda de aproximadamente 1,85% da soma de xilose e glicose (**Tabela 25**).

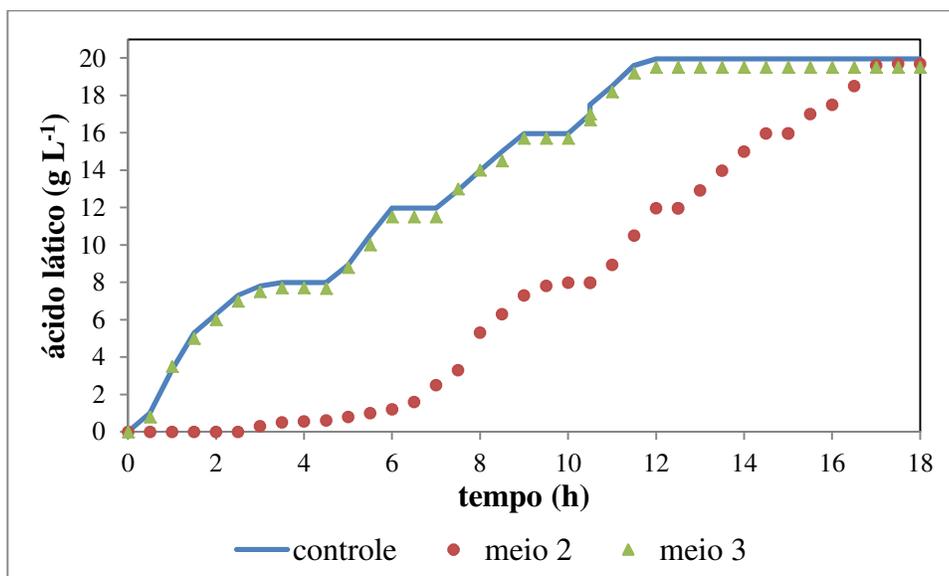
### 8.3.3. Fermentação

O potencial de utilização de hidrolisado hemicelulósico por *B. coagulans* 162 limita-se basicamente a dois pontos a serem considerados: sua capacidade de se utilizar pentoses com alta eficiência na conversão para ácido láctico e na sua resistência a inibidores naturalmente presentes no meio. Em estudos prévios, foi possível verificar que este microrganismo apresentou um comportamento notável no que se refere obtenção de alto rendimento e produtividade volumétrica utilizando pentoses como fonte de carbono. Entretanto, apesar de sua relativa resistência a inibidores, a remoção destes do meio se faz necessária para garantir condições ótimas para o crescimento microbiano, não comprometendo a produtividade volumétrica do processo.

Na fermentação do *B. coagulans* 162 em meio MRS<sub>1</sub> (controle) o microrganismo apresentou produtividade volumétrica igual a 0,831 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e rendimento igual a 0,95.

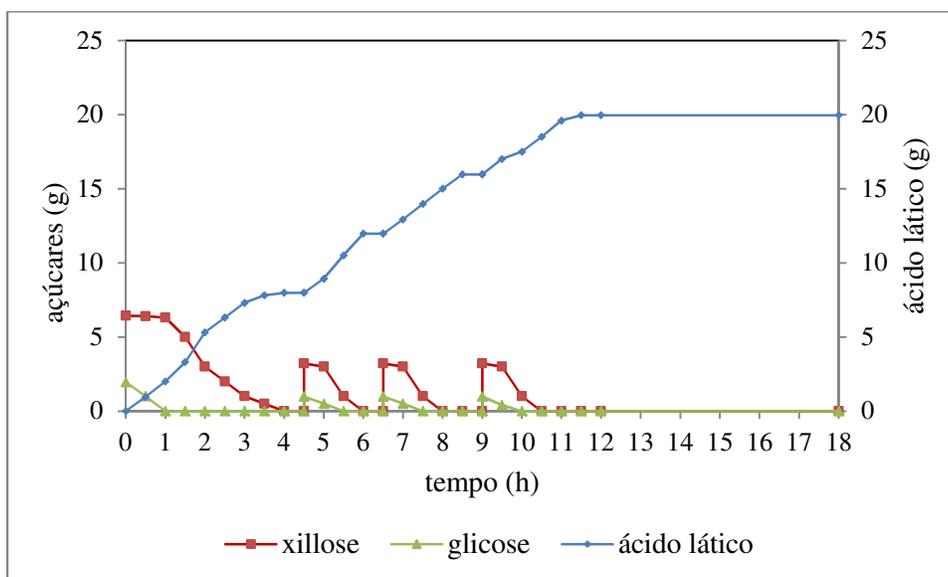
Na fermentação do *B. coagulans* 162 em meio MRS<sub>2</sub> (meio de cultivo sintético contendo inibidores), rendimento estatisticamente igual ao controle foi obtido, sendo igual a 0,94. Entretanto, uma fase de retardamento de aproximadamente 4h na produção foi observada, comprometendo a produtividade, se situando em 0,615 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Utilizando-se meio MRS<sub>3</sub> (meio de cultivo contendo hidrolisado hemicelulósico detoxificado), o microrganismo se comportou similarmente ao experimento em meio controle. Rendimento de 0,93 e produtividade volumétrica de 0,812 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> foram alcançados. O ácido acético, remanescente no Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado, não representou obstáculo ao crescimento *B. coagulans* 162. Os desvios podem ser observados na **Figura 47**.

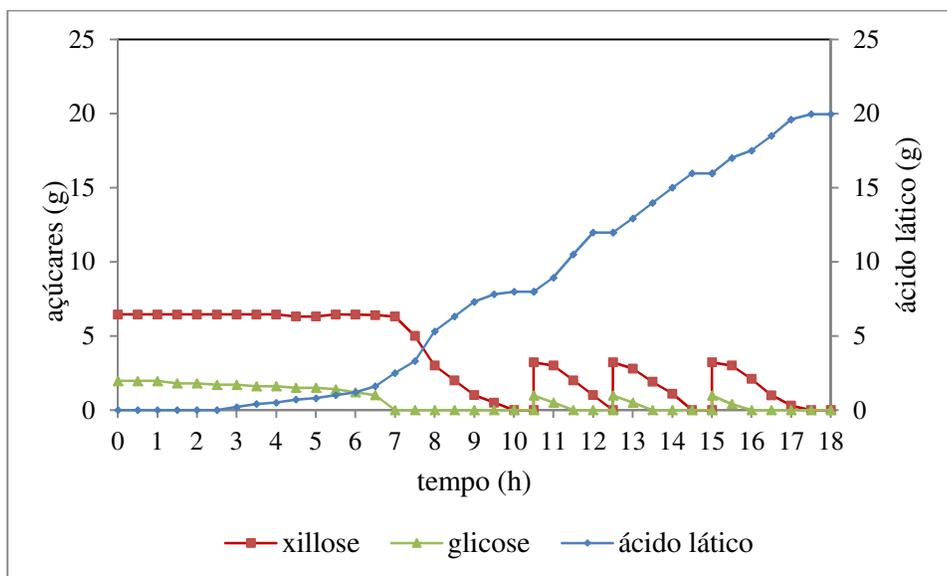


**Figura 47.** Fermentação de *B. coagulans* 162 em regime de batelada alimentada utilizando-se: 1) Meio de cultivo 1 ou Controle (meio MRS modificado contendo xilose e glicose sem inibidores); 2) Meio 2 (meio sintético, MRS modificado, contendo açúcares e inibidores e 3) Meio 3 (meio MRS modificado contendo Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado).

O meio contendo hidrolisado detoxificado obteve produtividade próxima ao controle, porém rendimento inferior. Isto pode ter ocorrido devido à presença de outros componentes presentes no hidrolisado que possam estar interferindo na produção de ácido láctico, mas que não foram considerados neste estudo ou removidos durante processo de detoxificação.



**Figura 48.** Fermentação de *B. coagulans* 162 em regime de batelada alimentada utilizando-se meio MRS<sub>1</sub> (Controle).



**Figura 49.** Fermentação de *B. coagulans* 162 em regime de batelada alimentada utilizando-se meio de cultivo 2, MRS modificado, contendo inibidores furfural, HMF e ácido acético.

Nesta fermentação também não foi observada fase lag, possivelmente pelo fato de ter sido o microrganismo, no inóculo, adaptado ao meio de cultivo contendo xilose como fonte de carbono.

**Tabela 26.** Parâmetros cinéticos obtidos na fermentação de *B. coagulans* 162 em meio MRS<sub>1</sub> (controle).

Etapa	S <sub>0</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub>	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )
Batelada (800mL)	8,40	0,95	3,581
1 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,20	0,95	2,708
2 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,20	0,95	2,028
3 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,20	0,95	1,624

**Tabela 27.** Parâmetros cinéticos obtidos na fermentação de *B. coagulans* 162 em meio MRS<sub>2</sub> (meio de cultivo sintético contendo inibidores).

Etapa	S <sub>0</sub> (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub>	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )
Batelada (800mL)	8,40	0,94	2,381
1 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,20	0,94	2,701
2 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,20	0,94	2,028
3 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,20	0,94	1,624

**Tabela 28.** Parâmetros cinéticos obtidos na fermentação de *B. coagulans* 162 em meio de MRS<sub>3</sub> (meio de cultivo contendo HHD).

Etapa	S <sub>0</sub> (g l <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub>	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )
Batelada (800mL)	8,23	0,93	3,550
1 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,12	0,93	2,702
2 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,12	0,93	2,015
3 <sup>a</sup> alimentação (400mL)	4,12	0,93	1,623

Um fato importante a ser considerado é que os valores de ácido láctico são superiores àqueles realmente obtido a partir de glicose e xilose porque uma pequena fração deste composto foi obtida a partir de outras fontes de carbono como o extrato de levedura, também presente no meio. Estudo preliminar mostrou que 4 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico são produzidas a partir de 15 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura.

Outro ponto a ser observado foi a produção de ácido acético no meio contendo hidrolisado, em quantidade maior que aquela obtida no meio sintético. Nos nossos estudos, consideramos apenas as variáveis xilose e glicose, ácido acético, furfural e HMF. Por se tratar de ser um meio de cultivo bem mais complexo que o sintético, o meio hidrolisado pode apresentar outros fatores não avaliados neste estudo e que talvez mereçam especial atenção numa produção em escala industrial.

É importante destacar que as fontes de ácido acético neste experimento são: 1) o hidrolisado hemicelulósico do qual não foi removido totalmente o ácido acético pelo carvão ativado e 2) aquele produzido pelo microrganismo. A quantidade de 0,82 g de ácido láctico detectado no início o processo (T0) deveu-se àquele produzido no inóculo.

Existem vários estudos utilizando linhagens de *Bacillus coagulans* para produção de ácido láctico descritos na literatura. Porém nenhum foi ainda descrito utilizando hidrolisado do bagaço de cana explodido a vapor.

OU *et al.* (2010) utilizaram a linhagem *B. coagulans* 36D1 para produzir ácido láctico em concentrações tão altas quanto 150-180 g L<sup>-1</sup> a partir de xilose e glicose em meio sintético. Para atingir tais concentrações, foi realizado experimento de sacarificação de celulose cristalina utilizando enzima fúngicas e fermentação simultâneas. Neste estudo foram obtidos 80 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico e eficiência próxima a 80%. Entretanto utilizou-se apenas meios sintéticos em condições ideais simulando o meio hidrolisado lignocelulósico. No hidrolisado lignocelulósico outras variáveis implicam no crescimento microbiano e na conversão em produtos.

PAYOT *et al.* (1999) otimizaram um meio de cultivo contendo sacarose e extrato de levedura com sais e fatores de crescimento para produção de ácido láctico pela bactéria *B. coagulans* TB/04, O experimento foi realizado em batelada e em regime contínuo para verificar a potencialidade e desempenho do microrganismo. Os autores verificaram que em condições aeróbicas a biomassa aumentava, mas a concentração de ácido láctico diminuía dramaticamente. Eles também identificaram um efeito inibitório pelo aumento da concentração de açúcares no meio. Os autores relatam ainda que a fonte de nitrogênio é o parâmetro mais importante para produção de ácido láctico e que o uso de extrato de levedura é fundamental para um bom desempenho do microrganismo, pois fornece ainda vitaminas e cofatores de crescimento.

PATEL *et al.* (2004) utilizaram a fração hemicelulósica do bagaço da cana de açúcar suplementado com sais minerais e xarope de milho para produzir ácido láctico por *Bacillus* sp., linhagem 17C5. A concentração de açúcares no hidrolisado foi de 81,3 g L<sup>-1</sup> (68,6 g L<sup>-1</sup> de xilose, 11,5 g L<sup>-1</sup> de glicose e 1,2 g L<sup>-1</sup> de arabinose). Os autores testaram diferentes concentrações iniciais de açúcar: 40, 60 e 72 g L<sup>-1</sup>. A fermentação foi inibida em concentrações superiores a 0,4 M (36 g L<sup>-1</sup>) de lactato e não passou de 0,6 M (54 g L<sup>-1</sup>), mesmo nos meios de cultivo com altas concentrações de açúcares. O microrganismo produziu L(+)-ácido láctico com pureza ótica superior a 99%.

Além da fração hemicelulósica, a fração celulósica do bagaço também tem sido investigada. Tal fração gera basicamente glicose e celobiose após hidrólise. ADSUL *et al.* (2007) utilizaram hidrolisado celulósico para produção de L(+)-ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* mutante UC-3 obtendo alta eficiência.

Outras fontes de carboidratos lignocelulósicos para produção de ácido láctico por *Bacillus* sp. também têm sido investigadas. WALTON *et al.* (2010) estudaram a viabilidade de obtenção de ácido láctico por *B. coagulans* MXL-9 a partir de extratos hemicelulósicos de Bordo, Faia, Álamo e Videiro da produção de polpa de papel. Os estudos mostraram que o microrganismo foi capaz de crescer utilizando todos os principais monossacarídeos encontrados no hidrolisado. Além disso, demonstrou alta tolerância a inibidores como o ácido acético. O estudo mostrou ainda que a fermentação de meio contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose na presença de 30 g L<sup>-1</sup> de ácido acético apresentou fase lag maior sem, contudo reduzir o rendimento em ácido láctico. Pequenas quantidades de co-produtos foram identificados como ácido fórmico, etanol e ácido acético. Em um de seus melhores resultados, os autores obtiveram eficiência de 94% na conversão em ácido

lático. NEUREITER *et al.* (2004) testaram a fermentação de *Bacillus* linhagem BS121, isolado de compostagem e silagem, em hidrolisado lignocelulósico de palha e madeira detoxificado. Neste estudo, foi verificada a incapacidade de metabolismo da arabinose pela linhagem testada. O ácido acético, já presente desde o início do processo, teve sua concentração aumentada para valores próximos a 3-4 g L<sup>-1</sup>. MAAS *et al.* (2008) utilizaram hidrolisado de palha de trigo para fermentação pela espécie *Bacillus coagulans* DSM 2314. Neste trabalho, foram obtidos 40,7g L<sup>-1</sup> de ácido lático com eficiência de 81% na conversão dos açúcares e pureza ótica de 97,2%.

Nossos estudos mostraram que o *Bacillus coagulans* 162 testado produziu ácido lático com pureza ótica próxima a 99% do isômero L(+). E diferentemente da linhagem testada por NEUREITER *et al.* (2004), verificou-se que *Bacillus coagulans* 162 foi capaz de utilizar arabinose presente no hidrolisado hemicelulósico. Entretanto, nenhuma consideração foi tecidas em relação a esta característica tendo em vista não se tratar de ser, a arabinose, principal expoente da composição de sacarídeos do substrato hemicelulósico extraído do bagaço da cana de açúcar.

#### 8.4. Conclusão

Durante concentração do hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar explodido a vapor, após cinco lavagens sucessivas do material tratado não se verificou significativo aumento do teor de açúcares que justificasse o emprego de mais etapas, alcançando-se concentrações de xilose, glicose e arabinose iguais a 10,73, 3,27 e 1,78 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os compostos inibidores furfural, HMF e ácido acético foram encontrados nas concentrações de 3,22, 2,04 e 12,8 após a quinta etapa, respectivamente. A etapa de detoxificação conseguiu remover 97% do furfural, 92% do HMF e 47% do ácido acético. Houve relativa pequena perda de açúcares neste processo, apenas 1,85% do teor total.

No meio MRS<sub>1</sub> (controle) o microrganismo apresentou produtividade volumétrica igual a 0,831 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e rendimento igual a 0,95. Na fermentação em meio 2, contendo inibidores obteve-se produtividade volumétrica igual a 0,615 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e rendimento igual a 0,94, onde uma fase lag de 5h na produção foi observada. Na fermentação em meio 3, contendo Hidrolisado Hemicelulósico Detoxificado, obteve-se produtividade volumétrica igual a 0,812 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e rendimento igual a 0,93,

*Bacillus coagulans* 162 produziu essencialmente L(+) ácido láctico, obtendo pureza de 99% deste isômero.



## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

*Bacillus coagulans* 162 se mostrou um microrganismo bastante eficiente na conversão dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico em ácido lático. Entretanto, encontrar um microrganismo eficiente não é o único quesito para torná-lo aplicável industrialmente. Vários fatores necessitam ser avaliados e melhorias sempre podem ser adotadas. De uma forma geral pode-se verificar que o *Bacillus coagulans* 162 possui características muito interessantes do ponto de vista industrial:

- Relativa tolerância a inibidores naturalmente presente em hidrolisados hemicelulósicos;
- Temperatura ótima de crescimento relativamente alta (entre 50-60°C), o que diminui o número de potencial contaminantes em produção em grande escala;
- Temperatura de crescimento próxima àquela da atividade das enzimas fúngicas para hidrólise de biomassa, o que permite o uso de sistema do tipo SSF (Fermentação simultânea à sacarificação);
- Habilidade de utilização de pentoses em suas principais vias metabólicas para produção de ácido lático;
- Alta eficiência na conversão de pentoses em ácido lático;
- Relativa baixa produção de biomassa, o que melhora seu desempenho em conversão em produtos em detrimento do número de células.

Além disto, embora organismos nativos sejam capazes de produzir determinados compostos de interesse industrial, eles normalmente regulam a produção estritamente para a seu crescimento e sobrevivência. Portanto, a manipulação de um microrganismo selvagem para fins de produção pode enfrentar desafios que limitam a melhoria do processo. A transferência para larga escala e modificação de vias metabólicas têm se tornado uma poderosa abordagem para a produção de metabólitos a partir de fontes renováveis. Como tal, os engenheiros biotecnólogos podem projetar sistemas metabólicos que combinam genes de diferentes organismos para a produção de combustíveis e compostos químicos (YAN & LIAO, 2009).

A busca por linhagens com aplicabilidade industrial se faz constante. Um fato conhecido ocorre com linhagens industriais de *S. cerevisiae*, que são geralmente superiores produtoras de etanol em razão sua alta tolerância a inibidores e capacidade de obtenção de alta produtividade sob condições industriais. Apesar de intensiva pesquisa na conversão de pentoses por leveduras nos

últimos 20 anos, até recentemente, apenas um limitado número de linhagens de *S. cerevisiae* industriais capazes de fermentar xilose tem sido geradas por modificações genéticas (MATSUSHIKA *et al.*, 2009). A produção de compostos químicos de alto valor agregado, como o ácido láctico, pode vislumbrar uma trajetória semelhante.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ADLER, E. (1977). Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Sci. Technol.* Vol.11, p.169-218.
- AGUILAR, R.; RAMIREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. (2002) Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, Vol.55, p.309-318.
- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. (2000) Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Biochemical Engineering*, p.187-198.
- ATKINS, P.W., 1990, Physical Chemistry, fourth ed. Oxford University Press, Oxford.
- AXE, D.D.; BAILEY, J.E. (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* Vol.47, p.8-19.
- AZHAR, A.F.; BERY, M.K.; COLCORD, A.R.; ROBERTS, R.S.; CORBITT, G.V. (1981) Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, p.293-300.
- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. (1981a) Development of resistance in *Saccharomyces cerevisiae* against inhibitory effects of Browning reaction products. *Enz. Microb. Technol.* Vol.3, p.24-28.
- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. (1981b) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.11, p.226-228.
- BARDET, M.; ROBERT, D.R.; LUNDQVIST, K. (1985) On the reactions and degradation of the lignin during steam hydrolysis of aspen wood. *Sven. Papperstidn.* Vol.6, p.61-67.
- BARRE, P. (1978) Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic, pentose utilizing *lactobacilli* from high temperature fermenting grape musts. *Journal of Applied Bacteriology* Vol.44, p.125-129.
- BECKER, M.E.; PEDERSON, C.S. (1950) The physiological characters of *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*). *J. Bacteriol.* Vol.59(6), p.717-725.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY* (1994) 9<sup>th</sup> Edition, Edited by John G. Holt, Copyright, Williams & Wilkins, Baltimore.
- BOYER, L.J.; VEGA, K.; KLASSON, K.T.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. (1992) The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioeng.* Vol.3 (1), p.41-48.
- BROWN, M.H.; BOOTH, I.R. (1991) Food Preservatives, third ed. Blackie and son, Glasgow/London.

- CAROLE, T.M.; PELLEGRINO, J.; PASTER, M.D. (2004) Opportunities in the industrial bio-based product industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.113-116, p.872-885.
- CASAL, M.; CARDOSO, H.; LEÃO, C. (1996) Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* Vol.142, p.1385-1390.
- CERNING, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology rev* Vol.87, p.113-130.
- CHANDEL, A. K.; CHAN, E. C.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M. L.; RAO, L. V.; RAVINDRA, P. (2007a) Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: An appraisal. *Biotechnol Mol Biol Rev* Vol.2, p.14-32.
- CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; NARASU, M. L.; VISWADEVAN, V.; KUMARAN, S. S. G.; RAVINDER, R.; RAO, L. V.; TRIPATHI, K. K.; LAL, B.; KUHAD, R. C. (2007b) Economic evaluation and environmental benefits of biofuel: An Indian perspective. *Int J Global Energy Issues* Vol.28, p.357-81.
- CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A. K.; KUHAD, R. C. (2007c) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501, *Biores Technol* Vol.98, p.1947-50.
- CHANDEL, A. K.; RUDRAVARAM, R.; RAO, L. V.; RAVINDRA, P.; NARASU, M. L. (2007d) Role of industrial enzymes in bio-industrial sector development: An Indian perspective. *J Commun Biotechnol* Vol.13, p.283-291.
- CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V.; RAO, L.V. (2010). Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art. *Sustainable Biotechnology* O. V. Singh and S. P. Harvey, Springer Netherlands, p.63-81.
- CHANDRA, R.P.; EWANICK, S.M.; CHUNG, P.A.; AU-YEUNG, K.; DEL RIO, L.; MABEE, W.; SADDLER, J.N. (2009) Comparison of methods to assess the enzyme accessibility and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnol Lett* Vol.31, p.1217-1222,
- CHUNG, I.S.; LEE, Y.Y. (1984) Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula. *Biotechnol. Bioeng.* Vol.27, p.308-315.
- COIMBRA, M.E.R; ELIAS, C.N.; COELHO, P.G. (2008) *In vitro* degradation of poly-L-D-lactic acid (PLDLA) pellets and poder used as synthetic alloplasts for bone grafting *J Mater Sci: Mater Med*, Vol.19, p.3227-3234.
- CONAB (2011) Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, janeiro/2011 - *Companhia Nacional de Abastecimento* – Brasília. Endereço eletrônico <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>
- CTC (2011) Centro de Tecnologia Canavieira Endereço eletrônico <http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=comcontent&view=article&id=367&Itemid=1323>

- DA SILVA, V.F.N. (2009) Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
- DE JONG, E.; VAN REE, R.; SANDERS, J.; LANGEVELD, H. (2009) Bio-refinery. In: H. Langeveld *et al.* (eds), *The bio-based economy: Biofuel, materials and chemicals in the post oil era*. London: Earthscan.
- DE MAN, J.D.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli* *Journal of Applied Bacteriology* Vol 23(21), p.130-135.
- DE VUYST, L.; LEROY, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food application. *J. Mol. Microbiology and Biotechnology* Vol.13, p.194-199.
- DE-PAULA, E.H.; RAMOS, L.P.; AZEVEDO, M.O. (1999) The potential of *Humicola grisea* var. *Thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* Vol.68, p.35-41.
- DIAZ DE VILLEGAS, M.E.; VILLA, P.; GUERRA, M.; RODRIGUEZ, E.; REDONDO, D.; MARTINEZ, A. (1992). Conversion of furfural into furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biotechnol.* Vol.12, p.351-354.
- DOGARIS, I.; KARAPATI, S.; MAMMA, D.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D. (2009) Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. *Bioresource Technology* Vol.100, p.6543-6549.
- DORNBURG, V.; FAAIJ, A.; PATEL, M.; TEUKENBURG, W.C. (2006) Economics and GHG emission reduction of a PLA bio-refinery system: combining bottom-up analysis with price elasticity effects. *Resources, conservation and recycling* Vol.46(4), p.377-409.
- DUNLOP, A.P. (1948) Furfural formation and behaviour. *Ind. Eng. Chem.* Vol.40(2), p.204-209.
- ERIKSSON, K.E.L.; BERMEK, H. (2009) Lignin, Lignocellulose, Ligninase. *Applied Microbiology: Industrial* p.373-384.
- FAN, L.T.; LEE, Y.H.; GHARPURAY, M.M. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* Vol.23, p.158-187.
- FAO (2011) Food And Agricultural Organization of United Nations. Endereço eletrônico: <https://www.fao.org.br/>
- FENGEL, D.; WENGER, G. (1989) Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter De Gruyter, Berlin, New York.
- FIREOVED, R.I.; MUTHARASAN, R. (1986) Effect of furfural and ethanol on the growth and energetics of yeast under microaerobic conditions. *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, p.433-447.
- FUKUI, S.; OI, A.; OBAYASHI, A.; KITAHARA, K. (1957) Studies on the pentose metabolism by microorganisms. 1, A new type-lactic acid fermentation of pentoses by lactic acid bacteria. *Journal Gen. Applied Microbiology* Vol.3(4), p.258-268.

- GARDE, A.; JONSSON, G.; SCHMIDT, A.S.; AHRING, B.K. (2002) Lactic acid production from wheat straw hemicelluloses hydrolisate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. ***Bioresource Technology*** Vol.81, p.217-223.
- GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. (2009) Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. ***Química Nova***, Vol.32(6), p.1500-1503.
- HOFVENDAHL, K; HAHN-HÄGERDAL, B. (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. ***Enzyme and Microbial Technology*** Vol.26, p.87-107.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011). Endereço eletrônico: <http://www.ibge.gov.br/>
- IMAI, T.; OHONO, T. (1995) The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ***Appl. Environ. Microbiol.*** Vol.61, p.3604-3608.
- INGRAM, M. (1975) The lactic acid bacteria – a broad view, p.1-13, In J.G. Carr, C.V. Cutting and G.C. Whiting (eds), *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. Fourth Long Ashton Symposium 1973, Academic Press, London.
- ITÄVAARA, M.; KARJOMAA, S.; SELIN, J.F. (2002) Biodegradation of polylactide in aerobic and anaerobic thermophilic conditions. ***Chemosphere*** Vol.46, p.879–885.
- JACQUET, N.; VANDERGHEM, C.; BLECKER, C.; PAQUOT, M. (2010) La steam explosion: application an tant que prétraitement de la matière lignocellulosique. ***Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*** Vol. 14, p.561-566.
- JOJIMA, T.; OMUMASABA, C.A.; INUI, M.; YUKAWA, H. (2010) Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. ***Appl Microbiol Biotechnol***, Vol.85, p.471-480.
- KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. (1998) Steam explosion of Sugarcane Bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. ***Biomass and Bioenergy*** Vol.14(3), p.277-287.
- KAMM, B.; KAMM, M. (2004) Biorefinery – Systems. ***Chem. Biochem. Eng. Q.*** Vol.18(1), p.1-6.
- KAMM, B.; KAMM, M. (2005) Biorefinery-carbohydrate line-product line lactic acid, Anaheim, CA.
- KANDLER, O. (1994) *Lactic acid bacteria In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> Edition, Ed. John G. Holt, Williams & Wilkins, Baltimore.
- KANDLER, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. ***Antonie van Leeuwenhoek*** Vol.49, p.209-224.
- KEGG PATHWAYS DATABASE (2012). Endereço eletrônico: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

- KIM, T.H.; LEE, Y.Y. (2005) Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. *Appl Biochem Biotechnol* Vol.121–124, p.1119–1131,
- KOVÁCS, A.T.; VAN HARTSKAMP, M.; KUIPERS, O.P.; VAN KRANENBURG, R. (2010) Genetic Tool Development for a New Host for Biotechnology, the Thermotolerant Bacterium *Bacillus coagulans*. *Applied and Environmental Microbiology* p.4085-4088.
- KOVÁCS, K.; MACRELLI, S.; SZAKACS, G. E ZACCHI, G. (2009) Enzymatic hydrolysis of Steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma* enzymes produced in house. *Biotechnology for Biofuels* Vol.2, p.14.
- KOVACS, K.; MACRELLI, S.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. (2009) Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for biofuels* Vol.2, p.1-14.
- LAPIERRE, C.; ROLANDO, C.; MONTIES, B. (1983). Characterization of poplar lignins acidolysis products: capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung* Vol.37, p.189-198.
- LARSSON, S. A. R.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L.J. (1999). "Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* Vol.77-79, p.91-103.
- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. (1998) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enz. Microb. Technol.* Vol.24, p.151-159.
- LEE, J. (1997) Review article: Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* Vol.56, p.1-24.
- LICHT, F.O (2005). **World Ethanol & Biofuels Report**. Várias edições.
- LITCHFIELD, J. H. (1996) Microbiological Production of Lactic Acid. *Advances in applied microbiology* Vol.42.
- LITCHFIELD, J. H. (2009) Lactic Acid, Microbially Produced. *Applied Microbiology: Industrial* p.362-372.
- MAAS, R.H.W.; BAKKER, R.R.; JANSEN, M.L.A.; VISSER, D.; JONG, E.; EGGINK, G.; WEUSTHUIS, R.A. (2008) Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol.78, p.751-758.
- MAPA (2011) *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Endereço eletrônico: <http://www.agricultura.gov.br/>
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. (2009) Ethanol production from xylose in engineering *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl. Microbiol Biotechnol*, Vol.84, p.37-53.

- MICHELSON, T.; KASK, K.; JÕGI, E.; TALPSEP, E.; SUITSO, I.; NURK, A. (2006). L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073, *Enzyme Microb. Technol.* Vol.39(4), p.861–867.
- MONTANE, D.; FARRIOL, X.; SALVADO, J.; JOLLEZ, P.; CHORNET, E. (1998) Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. *Biomass & Bioenergy* Vol.14(3), p.261-276.
- MORJANO, P.J.; GRAY, P.P. (1987) Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnol Bioeng* Vol.29, p.733–741.
- NANNINGA, G.L. (1983) Fermentation production of lactic acid. *Antonie van Leeuwenhoek* Vol.49, p.86.
- NAVARRO, A.R. (1994) Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: mathematical models. *Curr. Microbiol.* Vol.29, p.87-90.
- OKANO, K.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2010) Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Appl Microbiol Biotechnol* Vol.85, p.413-423.
- ORLA-JENSEN, S. (1919) *The Lactic Acid Bacteria*. Anhr. Fred. Host ans Son, Copenhagen.
- OU, M.S.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. (2010) L(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *Journal of Ind. Microbiology and Biotechnology*.
- OURA, E. (1977) Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem.* p.19-35.
- PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1999a) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* Vol.62, p.447-454.
- PALMQVIST, E.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1998). Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol.50, p.545-551.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol* Vol.74(1), p.17–24.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (1996) The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enz. Microb. Technol.* Vol.19, p.470-476.
- PALMQVIST, E.; MEINANDER, Q.; GRAGE, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1999b) Main and interaction effects of acetic acid, furfural and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* Vol.63, p.46-55.

- PAMPULHA, M.E.; LOUREIRO-DIAS, M.C. (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.31, p.547-550.
- PAMPULHA, M.E.; LOUREIRO-DIAS, M.C. (1990) Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.34, p.375-380.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* Vol.74, p.69-80.
- PARISI, F. (1989) Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. *Adv. Biochem. Eng.* Vol.38, p.53-87.
- PATEL, M. A.; OU, M.S.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. (2005). Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Crystalline Cellulose and Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to Lactate by a Thermotolerant Acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Progress* Vol.21(5), p.1453-1460.
- PATEL, M.A.; OU, M.S.; HARBRUCKER, R.; ALDRICH, H.C.; BUSZKO, M.L.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. (2006) Isolation and Characterization of Acid-Tolerant, Thermophilic Bacteria for Effective Fermentation of Biomass-Derived Sugars to Lactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* Vol.72(5), p.3228-3235.
- PATEL, M.A.; OU, M.S.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. (2004) Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* Vol.26, p.865-868.
- PAULILLO, L.F; VIAN, C.E.F.; SHIKIDA, P.F.A.; MELLO, F.T. (2007) Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis? *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Vol. 45(3), p.531-565.
- PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. (1999) Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* vol. 24, p.191-199.
- POPOFF, T.; THEANDER, O. (1976) Formation of aromatic compounds from carbohydrates part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chem. Scand. B* Vol.30, p.397-402.
- RHEE, M.S.; KIM, J.; QIAN, Y., INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. (2007) Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*. *Plasmid* vol.58, p.13–22.
- ROCHA, G.J.M; SILVA, F.T.; CURVELO, A.A.; ARAÚJO, G.T. (1997) Resumos do 5<sup>th</sup> *Brazilian Symposium on the chemistry of lignins and Other Wood Components*, Paraná, Brazil.
- RODRIGUES, G.A.; VENUS, J.; FRANCO, T.T. (2011) Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse to lactic acid. (artigo em submissão)

- ROTTENBERG, H. (1979). The measurement of membrane potential and DpH in cells, organelles and vesicles. *Methods Enzymol.* Vol.55, p.547-569.
- RUDEEKIT, Y.; NUMNOI, J.; TAJAN, M.; CHAIWUTTHINAN, P.; LEEJARKPAIT, T. (2008) Determining Biodegradability of Polylactic Acid under Different Environments. *Journal of Metals, Materials and Minerals* Vol.18(2), p.83-87.
- RUSSELL, J.B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* Vol.73, p.363-370.
- SAHA, B.C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *Journal of Ind. Microbiol Biotechnol* Vol.30, p.279-291.
- SAKA, S. (1991) Chemical composition and Distribution. Dekker, New York, p.3-58.
- SCHMIDT, A.S.; THOMSEN, A.B. (1998) Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresource Technology*, Vol.64, p.139-151.
- SCIENCE FORUM (2009). Endereço eletrônico: <http://.scienceforum2009.nl>
- SEARS, K.D.; BEÉLIK, A.; CASEBIER, R.L.; ENGEN, R.J.; HAMILTON, J.K.; HERGERT, H.L. (1971) Southern pine pre hydrolyzates: characterization of polysaccharides and lignin fragments. *J. Polym. Sci.* Vol.36, p.425-443.
- SHEN., L; WORRELL, E.; PATEL, M. (2010) Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* Vol.4, p.25–40.
- SONI, M.L., MEEHROTRA, R.N., KAPOOR, R.C., 1982, Dissociation constant and some thermodynamic parameters of levulinic acid. *Indian J. Chem. A* Vol.21, p.196-197.
- STOUTHAMER, A.H., 1979. The search for a correlation between theoretical and experimental growth yields. *Int. Rev. Biochem. Microb. Biochem.* Vol.21, p.28.
- SUORTTI, T. (1983) Identification of antimicrobial compounds in heated neutral glucose and fructose solutions. *Lebensm. Unters. Forsch.* Vol.177, p.94-96.
- TAHERZADEH, M.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. (1997) Acetic acid- friend or foe in anaerobic conversion of glucose to ethanol. *Chem. Eng. Sci.* Vol.52, p.2653-2659.
- TAHERZADEH, M.J., GUSTAFSSON, L., NIKLASSON, C., LIDÉN, G., 1999. Physiological effects of 5-hydroxymethyl-furfural (HMF) on *Saccharomyces cerevisiae*, submitted.
- TAHERZADEH, M.J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. (1998) Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* Vol.87, p.169-174.
- TANAKA T, KOMIYAMA A, SONOMOTO K, ISHIZAKI A, HALL SJ, STANBURY PF (2002) 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* Vol.60, p.160-167.

- TEMUDO, M.F.; MATO, T.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. (2009) Xylose anaerobic conversion by open-mixed cultures. *Biotechnological Products and Process Engineering*, Vol.82, p.231-239.
- THOEN, J.; BUSCH, R. (2006) Industrial chemicals from biomass – industrial concepts, In *Biorefineries - industrial processes and products: Status quo and future directions*, ed by Kamm B, Gruber PR and Kamm M. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- TSUJI, F. (2002) Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made poly-lactides: effects of L-lactide content, tacticity and enantiomeric polymer blending. *Polymer* Vol.43, p.1789-1796.
- ULBRICHT, R.J.; SHARON, J.; THOMAS, J. (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural and HMF in parental solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.* Vol.4, p.843-853.
- UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar (2011). Endereço eletrônico: <http://www.unica.com.br/>
- URBACH, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy products. *Int. Dairy Journal*, vol.5, p.877-903.
- USDOE – U.S. Department of Energy (2012). Endereço eletrônico: <http://energy.gov/>
- VACA-GARCIA, C. (2008) Bio-materials. In: Clark and Deswarte (eds), *Introduction to chemicals from biomass*, p. 103-142, Wiley series in renewable resources. Padstow, UK: Wiley.
- VAN HEININGEN, A. (2006) Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. *Pulp Pap Canada* Vol.107(6), p.38–43.
- VANHOLME, R.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. (2008) Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol.11, p.278-285.
- VAN SOEST, P.J. (1973). Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin. *J. Off. Anal. Chem.* Vol.56, p.781-784.
- VENUS, J. (2006) Utilization of renewables for lactic acid fermentation. *Biotechnological Journal* Vol.1, p.1428-1432.
- VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; DIJKEN, J.P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* Vol.8, p.501-517.
- VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. (1990) Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* Vol.136, p.405-412.
- VIEGAS, C.A., SÁ-CORREIA, I. (1995) Toxicity of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* at temperatures between 8.5 and 30°C. *Enzyme Microb. Technol.* Vol.17, p.826-831.

- VIEGAS, C.A.; SÁ-CORREIA, I. (1991) Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. **J. Gen. Microbiol.** Vol.137, p.645-651,
- VILLA, G.P. (1992) Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biotechnol.** Vol.12, p.509-512.
- VLASENKO, E.Y.; DING, H.; LABAVITCH, J.M.; SHOEMAKER, S.P. (1997) Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. **Bioresource Technology** Vol.59, p.109-119.
- WALTON, S.L., BISCHOFF, K.M., VAN HEININGEN, A.R.P.; VAN WALSUM, G.P. (2010) Production of lactic acid from hemicellulose extracts by *Bacillus coagulans* MXL-9. **J Ind Microbiol Biotechnol** Vol.37, p.823-830.
- WALTZ, E. (2008) Do biomaterials really mean business? **Nature Biotechnology**, Vol.6(8), p.851-853.
- WARTH, A.D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol.54 (8), p.2091-2095.
- WEAST, R.C. (1976). Handbook of Chemistry and Physics, Fiftysixth ed. CRC Press, Cleveland.
- WEIGERT, B.; KLEIN, K.; RIZZI, M.; LAUTERBACH, C.; DELLWEG, H. (1988) Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast *Pichia stipitis*. **Biotechnol. Lett.** Vol.10(12), p.895-900.
- WYMAN, C.E. (1994) Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresour. Technol.** Vol.50, p.3-16.
- WYMAN, C.E.; YANG B. (2009) Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs **California Agriculture** 63(4):185-190.
- XAVIER, S.; LONSANE, B.K. (1994) Sugar-cane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid-state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol.41, p.291-295.
- XU, J., THOMSEN, M.H.; THOMSEN, A.B. (2009) Enzymatic hydrolysis and fermentability of corn stover pretreated by Lactic acid and/or acetic acid. **Journal of Biotechnology**, vol.139, 300-305.
- YAN, Y; LIAO, J.C. (2009) Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. **J and Microbiol Biotechnol**, Vol. 36, p.471-479.
- YANG, B.; WYMAN, C.E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, vol.2, p.26-40.
- ZHANG, M.; EDDY, C.; DEANDA, K.; FINKELSTEIN, M.; PICATAGGIO, S. (1995) Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science**, vol.267, p.240-243.

ZHU, Y.; ZHANG, Y; LI, Y. (2009) Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiology Biotechnology*, vol.83, p.597-610.