



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



KAREN CRISTINA COLLOGRAI

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *LACTOBACILLUS FERMENTUM* EM  
PROCESSO FERMENTATIVO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Campinas  
2019

KAREN CRISTINA COLLOGRAI

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *LACTOBACILLUS FERMENTUM* EM  
PROCESSO FERMENTATIVO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química

Orientador: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Coorientador: Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA KAREN  
CRISTINA COLLOGRAI E ORIENTADA  
PELA PROFA. DRA. ALINE CARVALHO  
DA COSTA

Campinas

2019

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 132142/2017-1; FAPESP, 2017/04997-0 e 2016/06142-0

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

C698a Collograi, Karen Cristina, 1992-  
Avaliação da contaminação por *Lactobacillus fermentum* em processo fermentativo de bioetanol de segunda geração / Karen Cristina Collograi. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.  
Coorientador: Jaciane Lutz Ienczak.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Etanol. 2. *Lactobacilo*. 3. Contaminação. 4. Bactéria produtoras de ácido láctico. 5. Fermentação. I. Costa, Aline Carvalho, 1970-. II. Ienczak, Jaciane Lutz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effect of the contamination by *lactobacillus fermentum* in fermentative process of the second generation bioethanol

**Palavras-chave em inglês:**

Ethanol

*Lactobacillus*

bacterial contamination

Contamination

Acid latic bacteria

Fermentation

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Maria Letícia Bonatelli

Anderson de Souza Sant' Ana

**Data de defesa:** 14-02-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Karen Cristina Collograi e aprovada em 14 de fevereiro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos doutores\*:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Carvalho da Costa  
FEQ - UNICAMP

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Leticia Bonatelli  
CNPEM/CTBE

---

Dr. Anderson de Souza Sant'Ana  
FEA - UNICAMP

\* A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Bernadete e José, pelo carinho, dedicação e compressão durante a elaboração desse trabalho e na vida. A minha irmã, Karina, pelo aconselhamentos e discussões científicas.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Carvalho da Costa, e co-orientadora, Dr<sup>a</sup> Prof<sup>a</sup> Jaciane Lutz Ienczak, pela oportunidade, orientação e ensinamentos obtidos na elaboração dessa dissertação.

Ao CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) e ao LNBIO (Laboratório de biociências) pertencentes ao CNPEM/MCTIC por permitir a utilização das estruturas, Laboratório de Bioprocessos –CTBE e Espectrômetro de Massas –LNBIO, e pelo auxílio nas Análises de HPLC-CTBE.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luiz Carlos Basso (ESALQ –USP) por ceder a bactéria *L. fermentum* I2 e ao Lucas Lopes (ESALQ-USP) por fornecer dados e informações que auxiliaram na execução desse projeto.

Aos funcionários do CNPEM, especialmente a Marcia, Suzane e Rosenilda pelo auxílio nos experimentos e pelo compartilhamento de conhecimentos. À equipe de analítica pelo auxílio nas análises de HPLC e a Bianca e Romênia pelo auxílio no estudo de secretoma.

A todos os amigos do CTBE, especialmente ao Thiago, Cleilton e Fernan, pelo auxílio na execução dos experimentos, discussões científicas e ensinamentos.

As minhas amigas Amanda e Lauane pela amizade e pelo acolhimento.

Ao CNPQ (processo n<sup>o</sup> 132142/2017-1) pela bolsa de estudo e a FAPESP (Processo n<sup>o</sup> 2017/04997-0 e 2016/06142-0) pelo auxílio financeiro para a elaboração desse projeto.

A todos que ajudaram ou influenciaram diretamente ou indiretamente nesse projeto de pesquisa.

## RESUMO

O bioetanol de 1<sup>o</sup> geração (proveniente do melaço e caldo de cana-de-açúcar) possui processo fermentativo consolidado no Brasil. O processo Melle Boinot é caracterizado pela utilização de alta densidade e reuso celular e tratamento ácido. Essas estratégias têm como resultado baixo tempo de fermentação e alto rendimento de etanol, entretanto, um problema associado é a contaminação bacteriana. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são os principais contaminantes das destilarias brasileiras e em concentrações superiores à 10<sup>8</sup> UFC/mL pode resultar na perda de 1 à 5 % na eficiência fermentativa. A aplicação das estratégias do processo 1G na produção de bioetanol de segunda geração (2G) (obtido à partir de biomassa lignocelulósica) pode resultar no incremento da conversão de xilose em bioetanol, contudo, espera-se que a contaminação bacteriana seja um problema associado a esse processo. Nesse trabalho, o efeito da contaminação por *L. fermentum* I2 sobre o processo fermentativo de *S. passalidarum* NRRLY-27907 foi estudado em fermentações em batelada alimentada com alta densidade e reuso celular e tratamento ácido em meio composto por glicose e xilose. Na ausência da levedura, *L. fermentum* I2 foi capaz de consumir glicose e xilose em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) + xilose (com aminoácidos e vitaminas), mas não foi capaz de consumir açúcares em meio sintético (composto por glicose, xilose, ureia e sais). Em co-cultura com *S. passalidarum*, essa bactéria foi capaz de persistir no processo em concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL e produzir ácidos orgânicos, porém não se verificou a presença de floculação e perda de viabilidade da levedura. Em relação aos parâmetros fermentativos de *S. passalidarum* NRRL Y-27907, verificou-se que a presença da bactéria impactou apenas o consumo de xilose, sendo que tanto em cultura pura (*S. passalidarum*) como co-cultura (*S. passalidarum* e *L. fermentum*) a produção máxima de etanol foi equivalente à 21 g.L<sup>-1</sup> com produtividade volumétrica de 0,65 a 0,70 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Embora se tenha baixo efeito sobre os parâmetros fermentativos, a análise de secretoma demonstrou uma possível alteração no perfil de proteínas secretadas pela *S. passalidarum* na presença da bactéria.

Palavras chaves: *S. passalidarum*, *L. fermentum*, contaminação bacteriana, E2G

## ABSTRACT

First generation bioethanol (1G) (from sugarcane juice and molasses) has a consolidated fermentation process in Brazil. Melle Boinot process is characterized by high cell density, cell recycle and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yeast-cream treatment. These strategies result in a very short of the fermentation and high bioethanol production, however, are associated with bacterial contamination problems. *Lactobacillus* genus are the main bacteria isolated from tanks of Brazilian mills and in concentrations up to 10<sup>8</sup> CFU/mL results in the decrease of the 1-5 % of the volumetric ethanol yield. The use of the 1G strategies in second generation bioethanol production (2G) (from lignocellulosic biomass) may be an option to increase the conversion of the xylose into ethanol, but the bacterial contaminations can be a problem of this process. In this work, the effect of the bacterial contamination with *L. fermentum* I2 on the ethanol production by *S. passalidarum* NRRL Y-27907 was studied in fed-batch fermentations with high cell density, cell recycle and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yeast-cream treatment using glucose and xylose based synthetic broth. Without the yeast, *L. fermentum* I2 was able to consume glucose and xylose simultaneously in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) + xylose broth (with amino acids and vitamins), but was not able to consume sugars in glucose and xylose based synthetic broth (composed by glucose, xylose, urea and salts). In co-culture with *S. passalidarum* NRRL Y-27907, this bacteria was able to persist in the fermentation with concentration of the 10<sup>8</sup> CFU/ mL and produce organic acids but was not verified a decrease in viability and flocculation of the yeast.. The presence of the *L. fermentum* I2 affected only the xylose consumption by *S. passalidarum*, with maximum ethanol tittle equal to 21 g.L<sup>-1</sup> and ethanol volumetric productivity varied from 0.65 to 0.70 g.L<sup>-1</sup>. Though the effect of the contamination about the fermentative parameters of *S. passalidarum* was lower, the secretome study showed alteration in protein profile secreted by *S. passalidarum* in the presence of the bacteria.

Key words: *S. passalidarum*, *L. fermentum*, bacterial contamination, E2G

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cana-de-açúcar .....	19
Figura 2. Composição de Materiais lignocelulósico .....	20
Figura 3. Modelo clássico de degradação da celulose.....	24
Figura 4. Modelo clássico de degradação enzimática da hemicelulose .....	25
Figura 5. Processo Melle-boinot de fermentação.....	26
Figura 6. Proposta das vias metabólicas incluindo glicólise, via das pentoses fosfato, acúmulo de poliol e ciclo de Krebs simplificado em leveduras naturalmente fermentadoras de xilose.....	28
Figura 7. Filogenia de máxima probabilidade de concatenação de alinhamento de 136 genes ortólogos universais, com valores de bootstrap.....	29
Figura 8. Sumário de compostos produzido por diferentes BAL.....	35
Figura 9. Fluxograma descritivo dos experimentos e das análises em cada etapa do projeto.....	39
Figura 10. Microrganismos utilizados nesse projeto (imagem obtida em microscópio óptico). a) <i>S. passalidarum</i> (40 x) e b) <i>L. fermentum</i> (100 x). .....	40
Figura 11. Esquema representativo do sistema para a realização das fermentações em batelada alimentada. 1. Balança semi-analítica (Shimadzu® UX4200S); 2. Frasco de alimentação; 3. Bomba peristáltica; 4. Biorreator Bioflo® 3 L (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, NJ); 5. Alimentação; 6. Saída; 7. Entrada de oxigênio; 8. Agitador; 9. pHmetro; 10. Condensador; 11. Termômetro; 12. Trap. ....	44
Figura 12. Esquema representativo do biorreator após o início da alimentação. 1. Balança semi-analítica, 2. Bomba peristáltica e 3. Biorreator.....	45
Figura 13. Diagrama de blocos do processo fermentativo para cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ).....	46
Figura 14. Concentrador centrífuga 10 kDa MWCO Vivaspin (GE Healthcare) .....	52
Figura 15. Coluna Sepak (Waters C18) para dessalinização de amostras.....	53
Figura 16. Perfil do crescimento de <i>L. fermentum</i> I2 em relação ao tempo obtido por densidade óptica (600 nm) nos meios MRS + xilose, melão e meio sintético. ....	55
Figura 17. Consumo de açúcares e produção de produtos (ácido lático, ácido acético e bioetanol) pelo <i>L. fermentum</i> I2. a) MRS + xilose; b) melão; c) Meio sintético (glicose e xilose).....	57
Figura 18. Perfil de concentração de glicose, xilose, etanol e massa de célula seca (MCS) (g.L <sup>-1</sup> ) em relação ao tempo (h) em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■), etanol (▲) e MSC (▼).....	59
Figura 19. Perfil de concentração de glicose, xilose, etanol e massa de célula seca (MCS) (g.L <sup>-1</sup> ) em relação ao tempo (h) em fermentações em co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■), etanol (▲) e MSC (▼).....	60

Figura 20. Consumo de glicose e xilose e produção de etanol (g) em relação ao tempo (h) em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲).....	62
Figura 21. Consumo de glicose e xilose e produção de etanol (g) em relação ao tempo (h) em fermentações em co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲).....	63
Figura 22. Fatores de conversão de substrato (glicose e xilose) em produtos (etanol, CO <sub>2</sub> , xilitol, célula, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, glicerol e outros produtos) em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ). (a) Ciclo 1, (b) Ciclo 2 e (c) Ciclo 3. ....	67
Figura 23. Fatores de conversão de substrato (glicose e xilose) em produtos (etanol, CO <sub>2</sub> , xilitol, célula, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, glicerol e outros produtos) em fermentações em co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). (a) Ciclo 1, (b) Ciclo 2 e (c) Ciclo 3. ....	68
Figura 24. Velocidade específica (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) de consumo de glicose e xilose e produção de etanol em fermentações em pura cultura ( <i>S. passalidarum</i> ) em relação ao tempo (h). a) Ciclo 1; b) Ciclo 2; c) Ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲). ....	69
Figura 25. Velocidade específica (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) de consumo de glicose e xilose e produção de etanol em fermentações em pura cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentm</i> ) em relação ao tempo (h). a) Ciclo 1; b) Ciclo 2; c) Ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲). ....	70
Figura 26. Concentração de ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, glicerol e xilitol (g.L <sup>-1</sup> ) após 32 h em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e em co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). .....	71
Figura 27. Razão de ácidos totais (K <sub>AC</sub> ) (ácido acético, ácido láctico, ácido succínico), glicerol (K <sub>G</sub> ), célula (K <sub>C</sub> ) por etanol em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). a) K <sub>AC</sub> , b) K <sub>G</sub> e c) K <sub>C</sub> .....	74
Figura 28. Viabilidade (%) e brotamento (%) de <i>S. passalidarum</i> em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> I2). a) Viabilidade (%) - 0h; b) Viabilidade (%) - 32 h; c) Brotamento (%) - 0 h; d) Brotamento (%) - 32 h.....	75
Figura 29. Contagem de <i>S. passalidarum</i> e <i>L. fermentum</i> na base de LOG <sub>10</sub> para fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e em co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). a) <i>S. passalidarum</i> em cultura pura; b) <i>L. fermentum</i> em co-cultura; c) <i>S. passalidarum</i> em co-cultura. ....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégias de pré-tratamento e seus efeitos sobre a biomassa lignocelulósica.....	22
Tabela 2. Resumo de parâmetros cinéticos de fermentações com <i>S. passalidarum</i> obtidos a partir de dados da literatura: Produtividade volumétrica de etanol (Qe) (g.L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> ), fator de conversão de substrato em etanol (Yet/s) (g.g <sup>-1</sup> ), título de etanol (g.L <sup>-1</sup> ).....	32
Tabela 3. Composição dos meios MRS + Xilose, Melaço e Meio Sintético utilizados para o estudo do crescimento e consumo de açúcares pelo <i>L. fermentum</i> I2. ....	42
Tabela 4. Composição do meio de alimentação das fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ).....	45
Tabela 5. Consumo de glicose xilose e produção de etanol após 32 h de fermentação em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e co- cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ).....	61
Tabela 6. Parâmetros cinéticos de fermentações com <i>S. passalidarum</i> e <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> a 30 °C com dois ciclos celulares após 32 h. Fator de conversão de substrato em etanol (Yet/s) (g.g <sup>-1</sup> ), Rendimento em relação ao açúcar total consumido (Rendimento) (%), Consumo de glicose (%), Consumo de xilose (%), Produtividade volumétrica de etanol (Qp) (g.L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> ), Título de etanol (g.L <sup>-1</sup> ) e Rendimento em relação ao açúcar total disponível $\overline{R}$ (%). ....	64
Tabela 7. Proteínas secretadas por <i>S. passalidarum</i> (p<0,05) em relação aos ciclos fermentativos (ciclo 1 e 3) e tempo (0, 16 e 32 h) em fermentações em cultura pura ( <i>S. passalidarum</i> ) e co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ) (análises realizadas em triplicata). * Análise em duplicata. ....	77
Tabela 8. Caracterização das proteínas secretadas pela <i>S. passalidarum</i> em relação a função molecular e função biológica.....	78
Tabela 9. Proteínas de <i>L. fermentum</i> I2 (p<0.05) em fermentações em batelada alimentada em meio sintético 70:30 glicose: xilose para fermentações em co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ).....	80

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

FEQ- Faculdade de Engenharia Química

UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

CTBE- Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioetanol

LNBIO- Laboratório Nacional de Biociências

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

MCTI -Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicação

ESALQ - Escola superior de agricultura "Luiz de queiroz"

USP- Universidade de São Paulo

RFA - Renewable fuel association

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento

EUA -Estados Unidos da América

1G - Primeira Geração

2G- Segunda Geração

BALs - Bactérias ácido lácticas

HPLC -Cromatografia Líquida de Alta Performance

D.O - Densidade óptica

XR - Xilose redutase

XDH- Xilitol dehidrogenase

NADPH -Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADH- Dinucleótido de nicotinamida e adenina

RNA - Ácido Ribonucleico

ATP- Adenosina Trifosfato

rpm - Rotação por minuto

vvm - Volume de ar por volume de meio

OGM - Geneticamente Modificada

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	17
1.1.  Objetivo geral .....	17
1.2.  Objetivos específicos .....	17
CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.  Cana-de-Açúcar .....	18
2.2.  Bagaço de cana-de-açúcar.....	19
2.3.1.  Pré-tratamento.....	21
2.3.2.  Hidrólise enzimática .....	23
2.2.  Fermentação de pentoses .....	25
2.3. <i>Spathaspora passalidarum</i> .....	29
2.4.  Contaminação bacteriana.....	33
2.5. <i>Lactobacillus fermentum</i> .....	36
CAPÍTULO 3- METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	39
3.1.  Microrganismos .....	40
3.2.1. <i>S. passalidarum</i> NRRLY- 27907 .....	40
3.2.2.  Propagação <i>L. fermentum</i> I2.....	41
3.2.  Caracterização do crescimento e consumo de açúcares por <i>L. fermentum</i> I2 em diferentes meios fermentativos.....	42
3.3.  Fermentações em batelada alimentada com reuso celular .....	43
3.4.1.  Determinação da concentração celular em massa seca .....	46
3.4.2.  Viabilidade celular .....	47
3.4.3.  Plaqueamento .....	47
3.4.4.  Determinação da concentração de açúcares, ácidos orgânicos e etanol.....	48
3.7.  Secretoma.....	51
3.7.1.  Obtenção e preparo da amostra .....	51

3.7.2. Digestão das proteínas.....	52
3.6.3. Análise em cromatografia líquida seguida por espectrometria de massa (LC-MS/MS).....	53
3.6.4. Análise de dados.....	53
CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
4.1. Caracterização do crescimento e consumo de açúcares por <i>L. fermentum</i> I2 em diferentes meios fermentativos. ....	54
5.2. Determinação do efeito da contaminação bacteriana por <i>L. fermentum</i> I2 no processo fermentativo por <i>S. passalidarum</i> em meio sintético. ....	58
5.3. Subprodutos em fermentações em cultura pura ( <i>S.passalidarum</i> ) e co-cultura ( <i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i> ). ....	71
CAPÍTULO 5- CONCLUSÃO.....	83
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86

## CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

A migração para fontes de energias renováveis (como solar, hidráulica, eólica e provinda de biomassa) tem se tornado necessária devido aos impactos ambientais causados pela exploração de petróleo e carvão. Um dos substituintes da gasolina (proveniente do petróleo) mais importante é o bioetanol, pois possui baixo impacto econômico e ambiental, uma vez que apresenta menores custos de produção em relação a derivados de fontes fósseis e menores emissões de gases do efeito estufa (JÖNSSON e MARTÍN, 2016; SANTOS et al., 2016 a).

De acordo com *Renewable fuels association* (RFA) (2017), os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil são atualmente os maiores produtores desse biocombustível, sendo a soma da produção desses países corresponde a 85 % da produção mundial. 59,8 bilhões e 26 bilhões de litros de bioetanol foram produzidos pelo EUA e Brasil, respectivamente, no ano 2017.

No Brasil, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é a cultura dominante para a produção do bioetanol, que foi impulsionado pelo programa “Pró-Alcool”, lançado em 1975, em resposta à crise do petróleo de 1973. O objetivo era a diminuição dos preços dos combustíveis e da dependência de petróleo importado, através da obtenção de bioetanol anidro para mistura com a gasolina. A obtenção de um veículo movido unicamente por esse biocombustível foi foco de estudo apenas após a crise do petróleo de 1979, contudo, a descoberta de novas reservas de petróleo em 1980 resultou na perda de subsídios para o setor (MOREIRA e GOLDEMBERG,1999; AMORIM et al., 2011; LOPES et al., 2016).

De acordo com o Ministério de Minas e Energia (2018), o governo federal pretende realizar a expansão na produção de biocombustíveis no país, através do RenovaBio, que consiste de uma Política Nacional de Biocombustíveis instituída pela lei nº 13.576/2017. A base desse programa consiste na expansão da produção por meio da previsibilidade, da sustentabilidade ambiental, econômica e social, e compatível com o crescimento do mercado.

A produção de bioetanol através de melaço ou caldo de cana (bioetanol de 1º geração-1G) possui processo consolidado, uma vez que essa tecnologia é empregada comercialmente nos últimos 30 anos (MACRELLI et al. 2012). Esse processo é o *Melle-boinot*, que se caracteriza pelo processo em batelada alimentada, alta concentração de células (entre 30-40 g.L<sup>-1</sup>) e reuso celular, resultando em rendimentos de 92-93 % do valor teórico (conversão dos açúcares em bioetanol) e menor tempo de fermentação (BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011).

Um problema comum nas plantas de bioetanol 1G é a contaminação por bactérias e/ou por leveduras nativas (*Saccharomyces* e outras espécies não *Saccharomyces*), principalmente por bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bacillus*. Estima-se que uma contaminação de  $10^8$  unidades formadoras de colônia de bactéria por mL (UFC. mL<sup>-1</sup>) pode resultar na perda de 10.000 a 30.000 litros de bioetanol por dia em uma produção de um milhão de litros; além disso, a floculação pode ser induzida, inibindo a fermentação e dificultando o processo de centrifugação (AMORIM et al. 2011).

Dentre as bactérias do gênero *Lactobacillus* tem-se destaque para a espécie *L. fermentum*, que possui alta persistência no processo (LUCENA et al., 2010) e está associada com floculação em dornas industriais (CARVALHO-NETTO et al. 2015), alta produção de ácidos orgânicos e baixa produção de etanol (REIS et al., 2018).

Uma oportunidade de expansão na produção de bioetanol no Brasil é a utilização da palha e do bagaço de cana-de-açúcar como matéria prima (bioetanol de 2º geração – 2G). Anualmente as usinas sucroalcooleiras geram em torno de 100 milhões de toneladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar, que são deixados no campo ou queimados para geração de energia (SANTOS et al., 2016a; AMORIM et al, 2011). No Brasil, existem duas plantas industriais de bioetanol 2G, Raízen (<http://www.raizen.com.br>) e Granbio (<http://www.granbio.com.br>). Embora exista a produção comercial, o custo de produção ainda continua alto, devido ao desgaste de equipamentos de pré-tratamento e das enzimas utilizadas na etapa de hidrólise (CARPIO e SOUZA, 2017; LOPES et al., 2016).

Na etapa de fermentação um dos desafios é a obtenção de microrganismos capazes de converter todos os açúcares do hidrolisado lignocelulósico em etanol. Esses açúcares consistem majoritariamente de glicose e xilose, obtidos da celulose e hemicelulose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise (HOU e SHOU, 2012; CARVALHO, QUEIROZ e COLODETTE, 2016).

Naturalmente existem muitas leveduras capazes de utilizar pentoses, entretanto apenas 1% é capaz de realizar a conversão desses açúcares em bioetanol (HAHN-HÄGERDAS et al., 2007). Dentre essas leveduras está *S. passalidarum*, que possui a capacidade de metabolizar xilose tão rapidamente quanto glicose e co-utilizar como fonte de carbono, glicose, xilose e celobiose. Além disso, essa levedura demonstra melhor desempenho na conversão de xilose em etanol na condição de anaerobiose em relação *S. stipitis*, que é referência na fermentação de xilose (NGUYEN et al., 2006; HOU, 2012; LONG et al., 2012; VERAS et al., 2017).

Vários fatores podem influenciar na capacidade natural de metabolizar xilose, como concentração inicial celular e de açúcares, pH, temperatura, inibidores e adição de suplementos (NAKANISHI et al., 2017).

As estratégias utilizadas no processo 1G vêm sendo estudadas para incrementar o consumo de xilose. Santos et al (2015) estudou o efeito do aumento gradual da concentração de açúcares e reuso celular em fermentações com *S. stipitis*. Em outro estudo Nakanishi et al (2017), utilizou alta concentração celular e reuso celular com *S. passalidarum* em fermentação em hidrolisado de bagaço de cana. O reuso celular é uma estratégia consolidada no processo de produção de bioetanol 1G, pois leveduras mais resistentes podem ser obtidas através de pressão seletiva (um tipo de adaptação evolutiva) que seleciona indivíduos mais resistentes às condições de estresse do processo fermentativo (BASSO et al.; 2008).

Embora o uso dessas estratégias possa representar um incremento na conversão de xilose em bioetanol, está associado com a contaminação bacteriana, o que pode representar um problema para o processo 2G. A literatura disponível não descreve o efeito de bactérias contaminantes sobre leveduras naturalmente fermentadoras de xilose. Desta forma, esse trabalho visa estudar o efeito da contaminação por *L. fermentum* I2 sobre o processo fermentativo de *S. passalidarum* NRRLY- 27907 em meio composto por glicose e xilose.

## OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo analisar o efeito da contaminação por *Lactobacillus fermentum* I2 em processo fermentativo de segunda geração, através do estudo do impacto na co-fermentação de glicose e xilose pela levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907.

### 1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de *L. fermentum* I2 crescer e consumir açúcares em meios fermentativos com diferentes açúcares e nutrientes;
- Verificar o efeito da contaminação por *L. fermentum* I2 nos parâmetros fermentativos de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 em meio sintético composto por glicose e xilose em um sistema que mimetize o processo de fermentação estabelecido (e bem sucedido) nas destilarias de primeira geração;
- Analisar o desenvolvimento e manutenção da contaminação bacteriana através do crescimento celular e produção de ácido orgânicos no sistema com *S. passalidarum*;
- Determinar o efeito do tratamento ácido no controle da contaminação bacteriana;
- Verificar proteínas secretadas pela levedura em resposta à contaminação bacteriana.

## CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cana-de-Açúcar

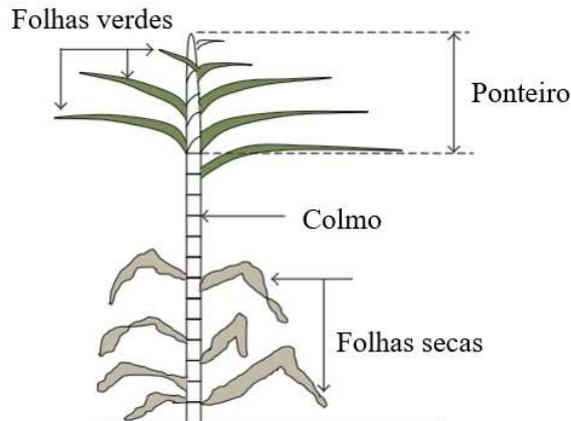
A cana-de-açúcar é uma gramínea perene do gênero *Saccharum*, que se desenvolve em regiões de clima quente, comumente tropicais, como Brasil, Índia, África e Pacífico Asiático. No Brasil, essa cultura foi introduzida no Nordeste no século 17, com o objetivo de romper o monopólio francês na produção de açúcar. O cultivo para a produção de bioetanol foi impulsionado apenas em 1975, como estratégia para driblar os baixos preços do açúcar e diminuir a dependência de petróleo importado (CANILHA et al, 2012; MOREIRA e GOLDEMBERG,1999).

Atualmente, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2018), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar; em números a produção nacional na safra 2017/2018 correspondeu a 633,26 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 27,76 bilhões de litros de bioetanol e 37,87 milhões de toneladas de açúcar. Em relação à safra 2016/2017, houve uma queda de 3,6 % na produção de cana-de-açúcar, o que impactou a produção de açúcar e bioetanol, com redução de 2,1 % e 0,2 %, respectivamente. Nessa safra uma maior parte da cana-de-açúcar foi destinada para a produção de bioetanol anidro, uma vez que o consumo desse biocombustível aumentou a partir de outubro de 2017.

Estruturalmente, essa planta é caracterizada por ser formada por duas frações: colmo e palha (Figura 1). O colmo corresponde à parte onde se encontram o caldo de cana (usado para a produção de açúcar e bioetanol) e o bagaço (resíduo da moagem). A palha corresponde às folhas verdes e secas e ao ponteiro (CANILHA et al, 2012).

No processo para a produção de bioetanol de primeira geração, apenas um terço da massa da planta é utilizada para a produção de bioetanol e açúcar, enquanto um terço referente ao bagaço é queimado para a geração de energia e um terço é deixado no campo para a decomposição por microrganismos (DUSSÁN et al, 2016)

Figura 1. Cana-de-açúcar



Fonte: CANILHA et al, 2012.

A queima do bagaço de cana é utilizada pelas usinas sucroalcooleiras para a produção da energia que pode ser usada no processo e/ou vendida para o abastecimento de cidades. O melhor aproveitamento do vapor e a utilização de caldeiras mais eficientes podem resultar em uma maior produção de energia com menor quantidade de bagaço queimado, resultando em excedente que poderia ser utilizado para a produção de bioetanol 2G. Isso aumentaria a produção por hectare e permitiria a produção contínua durante todo o ano, visto que a cana-de-açúcar é sazonal e não pode ser armazenada, resultando em 4 a 6 meses sem operação (AMORIM et al, 2011).

## 2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço é um resíduo sólido resultante do processo de extração do caldo da cana-de-açúcar, que é a matéria prima utilizada na produção de açúcar e bioetanol (1G). Essa biomassa lignocelulósica é composta por (%): celulose (36,9-45,7), hemicelulose (25,6-29,6) e lignina (18,9-26,1) (ROCHA et al., 2015).

A celulose é um polissacarídeo linear não ramificado composto por monômeros de glicose ligados através de ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-4). A presença de ligações de hidrogênio inter e intramolecular presentes na celulose confere característica recalcitrante, devido às cadeias empacotadas com regiões de alta cristalinidade interrompidas por regiões amorfas com baixa ordem molecular. A recalcitrância dessa matriz dificulta a sua conversão tanto por via química como biológica (SILVEIRA et al., 2015; ZABED et al, 2016).

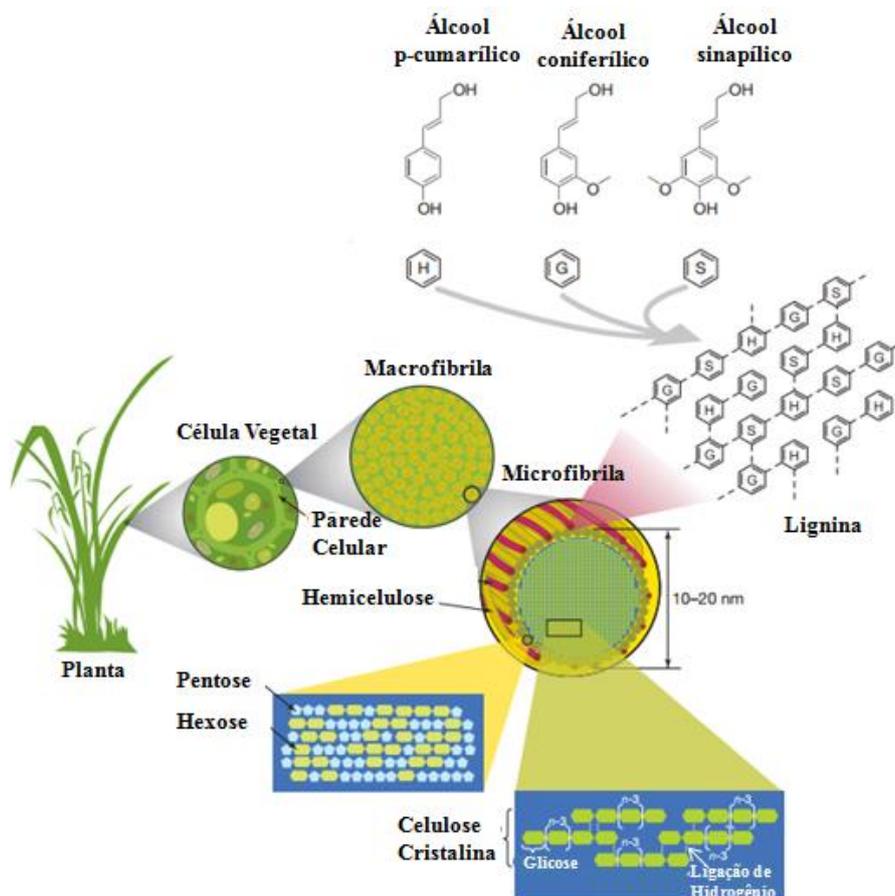
A hemicelulose é um polissacarídeo ramificado composto por diferentes monossacarídeos, como D-manose, D-galactose, D-xilose, D-glicose, D-ácido glucurônico, L-arabinose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico, L-ramnose e ácido D-galacturônico. Esse

polissacarídeo apresenta ligações  $\alpha$ -glicosídicas e  $\beta$ -glicosídicas e, diferente da celulose, não apresenta regiões cristalinas. A xilose é o monômero predominante na hemicelulose e sua conversão em bioetanol é necessária para a viabilidade do processo de segunda geração (SILVEIRA et al.; 2015, NAKANISHI et al.; 2017).

A lignina é um composto polifenólico amorfo com massa molecular indefinida, sendo predominantemente composta por álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Devido a sua alta hidrofobicidade, pode ocorrer a adsorção irreversível de celulases e outras proteínas na superfície, resultando em diminuição na eficiência de hidrólises enzimáticas (RUBIN, 2008; SILVEIRA et al.; 2015).

Celulose, hemicelulose e lignina formam estruturas chamadas de microfibrila, que são organizadas dentro de macrofibrilas (Figura 2), responsáveis por conferir a estabilidade da parede celular (RUBIN, 2008).

Figura 2. Composição de biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de RUBIN, 2008.

### 2.3. Conversão de biomassa lignocelulósica em bioetanol

O bioetanol obtido a partir de biomassa lignocelulósica (madeira, resíduos de produção agrícola, culturas energéticas, etc) é conhecido como bioetanol de segunda geração (2G) (PAULOVA et al, 2015). Esse biocombustível é obtido através da conversão dos polissacarídeos presentes na biomassa em açúcares fermentescíveis, seguido pela conversão destes em bioetanol. Para isso são requeridas as etapas de pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação de produtos (KUMAR et al.,2009; ZABED et al., 2016).

#### 2.3.1. Pré-tratamento

No processo de segunda geração a etapa de pré-tratamento é requerida para a modificação estrutural da biomassa, devido a sua baixa digestibilidade, onde em processos enzimáticos corresponde a valores inferiores a 20% para materiais *in natura*. Desta forma, essa etapa é importante para tornar a celulose mais acessível à degradação por enzimas e ácidos, resultando em maior rendimento de açúcares fermentáveis (MOSIER et al., 2005).

A desconstrução do complexo lignina-celulose-hemicelulose é necessária devido à alta robustez e característica recalcitrante que é conferida pela presença de ligações de hidrogênio e covalentes que ligam a celulose e hemicelulose com a lignina. Esse processo também é importante para a despolimerização, uma vez que pode estar relacionado com a solubilização da lignina, diminuição da cristalinidade da celulose, aumento da área superficial e porosidade da biomassa (ZABED et al., 2016).

O pré-tratamento ideal tem como objetivo: minimizar a formação de compostos inibitórios; diminuir a carga enzimática requerida para a hidrólise; prevenir da perda de açúcares; permitir a recuperação da lignina e outros compostos e minimizar o uso de energia. Os métodos de pré-tratamento de biomassa podem ser divididos em: físicos, químicos, físico-químicos, biológicos e uma combinação destes (Tabela 1) (SILVEIRA et al.; 2015, KUMAR et al.; 2009).

Tabela 1. Estratégias de pré-tratamento e seus efeitos sobre a biomassa lignocelulósica

Métodos	Efeito na biomassa	Exemplos/reagentes
Físico	Diminuição da partícula, aumento da porosidade, despolimerização e diminuição da cristalinidade da celulose	Moagem Trituração
Químico- Ácido	Hidrólise da hemicelulose em monossacarídeos	Catálise através de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , SO <sub>2</sub> , HCl, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Químico – Alcalino	Remoção da lignina e parte da hemicelulose	NaOH, Ca(OH) <sub>2</sub> e NH <sub>3</sub>
Físico-químico	Diminuição da área superficial, diminuição da cristalinidade da celulose e pode realizar a remoção total ou parcial da lignina e/ou hemicelulose	Explosão a vapor Hidrotérmico
Biológico	Pode realizar a degradação de parte da lignina e da hemicelulose	Fungos que agem na desconstrução da biomassa ( <i>Punctularia sp</i> TUFC20056, <i>P.chryso sporium</i> )

Fontes: JÖNSSON e MARTÍN, 2016; ZABED et al.,2016; SINDHU, BINOD e PANDEY, 2016.

A composição do hidrolisado lignocelulósico obtido por pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio foi utilizada como referência nesse trabalho. Nakanishi et al (2017) obtiveram um hidrolisado lignocelulósico livre de inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetil furfural) com 43 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 15 g.L<sup>-1</sup> de xilose (80:20 glicose: xilose) através de pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio seguido por hidrólise enzimática.

A escolha do pré-tratamento utilizado é uma etapa importante, pois a utilização de condições severas de processos, como alto tempo de residência, alta temperatura e/ou concentração de ácidos, é responsável pela formação de inibidores, que consistem em hidroximetilfurfural (HMF), furfural, ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico) e compostos fenólicos (PALMQVIST, 2014)

O pré-tratamento alcalino caracteriza-se pela obtenção de duas correntes, uma sólida e outra líquida. A corrente sólida possui alta digestibilidade, pois parte da lignina e dos grupos acetil e vários grupos de ácido urânicos são removidos ou substituídos na hemicelulose. A corrente líquida é rica em lignina, acetato, extrativos e produtos da degradação dos açúcares (KARP et al., 2015; CARVALHO et al., 2015). O hidrolisado lignocelulósico obtido após a etapa de hidrólise da corrente sólida possui como característica a ausência de ácido acético, que em concentrações acima de 2-5 g.L<sup>-1</sup> inibe a fermentação da xilose (NAKANISHI et al., 2017) por *S. passalidarum*.

### 2.3.2. Hidrólise enzimática

A hidrólise consiste na etapa onde ocorre a conversão dos polissacarídeos em monômeros e esse processo pode ser realizado enzimaticamente pela utilização de celulasas, hemicelulasas e  $\beta$ -glicosidasas ou através de ácidos (diluído ou concentrado), como o sulfúrico (MOSIER, et al., 2005, KUMAR et al.; 2009).

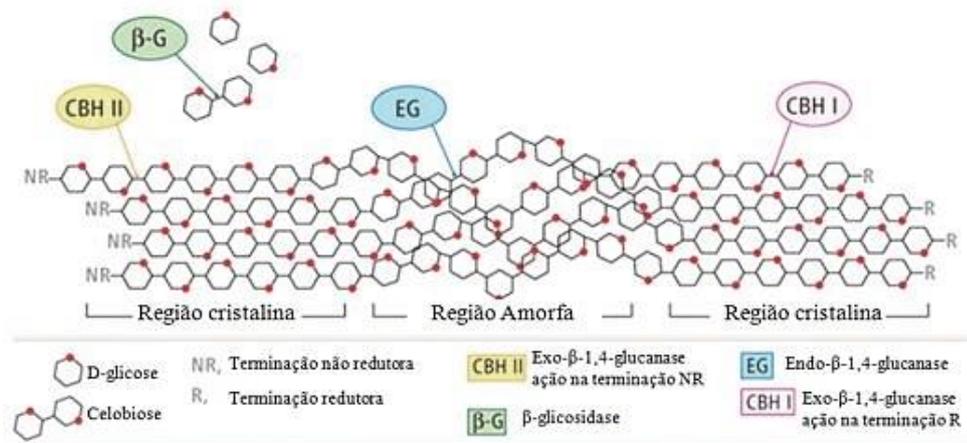
O processo com ácido diluído é facilmente realizado e requer pouco tempo, porém possui baixa seletividade, o que resulta em baixa conversão da celulose em glicose, tendo conseqüentemente baixa produção de bioetanol. Nesse processo em geral se utilizam concentrações de ácidos equivalente a 2-5% e temperatura na faixa de 160 a 230 °C. A hemicelulose pode ser facilmente hidrolisada com ácido diluído sob condições moderadas, entretanto, extremas condições são requeridas para a celulose (KUMAR et al.; 2009).

O processo com ácido concentrado possui alto rendimento de bioetanol, uma vez que 100% da celulose é convertida em glicose. Nesse processo concentrações de ácido equivalente a 10-30 % são utilizadas, temperatura menor que 50 °C e pressão atmosférica; contudo, são requeridos equipamentos altamente resistentes a corrosão e há formação de inibidores. Nesse processo a fração hemicelulósica é degradada mais rapidamente que a fração de celulose, resultando em exposição de monossacarídeos a um longo tempo reacional, levando a perda e degradação dos açúcares e formação de inibidores. Para um processo viável e ambientalmente correto é necessário que seja realizada a recuperação do ácido (KUMAR et al.2009, RABELLO, 2010).

Em relação ao processo químico, a hidrólise enzimática possui como vantagem a utilização de condições moderadas, ser um processo não corrosivo e ter alta seletividade. Durante esse processo o uso de celulasas, hemicelulasas,  $\beta$ -glicosidasas e enzimas acessórias, é necessário para a quebra dos polissarídeos da biomassa (GOTTSCHALK e BOM, 2010).

A conversão da celulose em glicose por via enzimática (Figura 3) consiste na utilização das enzimas endoglucanases (EG, E.C. 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, E.C.3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidasas ( $\beta$ -G, E.C. 3.2.1.21). Nesse processo a endoglucanase atua internamente na celulose expondo as terminações redutoras e não redutoras, onde a exoglucanase realiza a quebra em celobiose e celuoligossacarídeos, em que a celobiose é convertida pela  $\beta$ -glicosidase em duas moléculas de glicose (GOTTSCHALK e BOM, 2010).

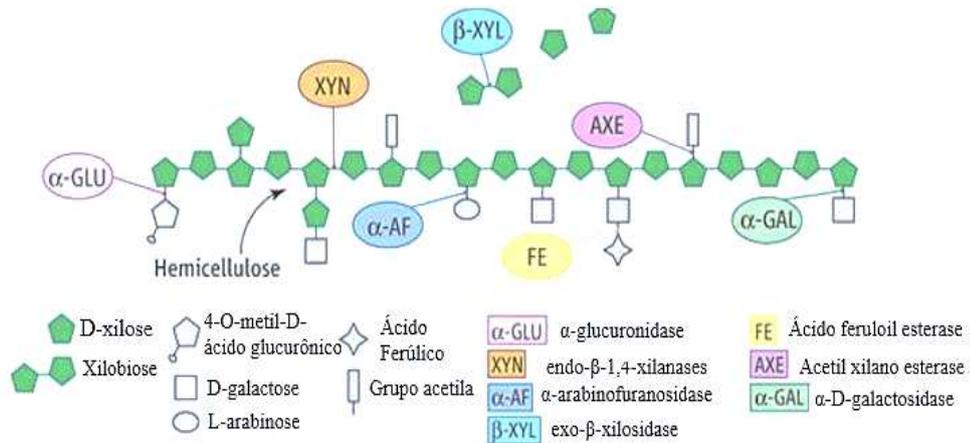
Figura 3. Modelo clássico de degradação da celulose



Fonte: DUTTA e WU, 2014.

A despolimerização da xilana presente na hemicelulose é realizada pela ação das enzimas endo- $\beta$ -1,4-xilanases (E.C.3.2.1.8), exo- $\beta$ -xilidase (E.C.3.2.1.37) e pelas enzimas de desconstrução como acetil-xilanaesterase (E.C.3.1.1.72),  $\alpha$ -arabinofuranosidase (E.C.3.2.1.55), acetilmannanesterase (E.C.3.1.1.6), ácido feruloilesterase (E.C.3.2.1.73), p-cumarilícoesterase (E.C.3.2.1.73) e  $\alpha$ -glucuronidase (E.C.1.139). A representação da ação dessas enzimas está demonstrada na Figura 4.

Figura 4. Modelo clássico de degradação enzimática da hemicelulose



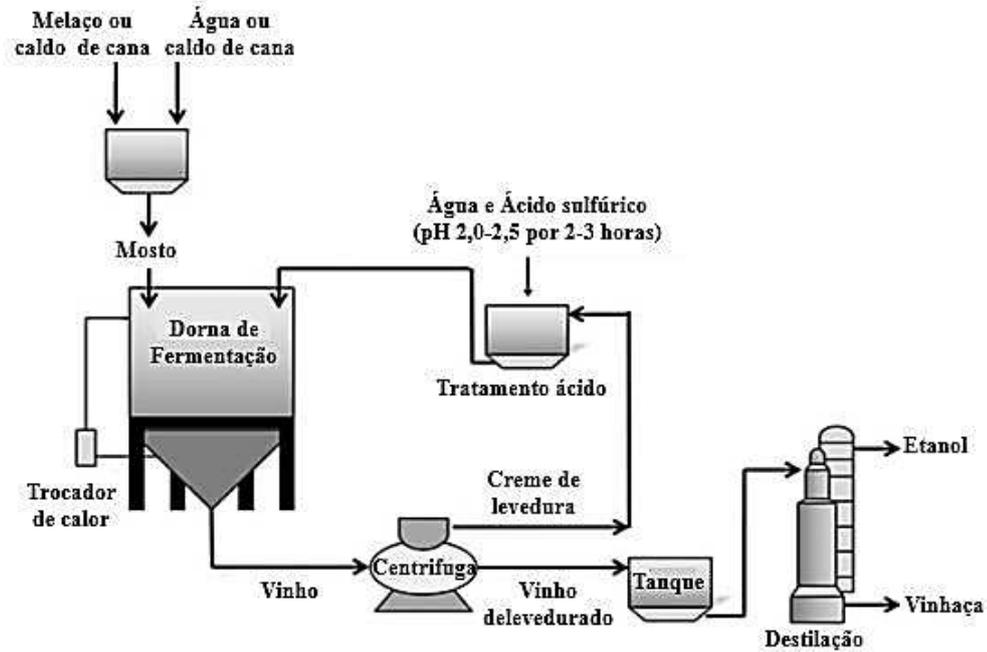
Fonte: DUTTA e WU, 2014.

## 2.2. Fermentação de pentoses

No Brasil, o processo fermentativo de produção de bioetanol 1G é consolidado nas usinas sucroalcooleiras. Esse processo foi criado por Firmino Boinot em 1930 nas destilarias da região de Melle e vem sendo aperfeiçoado para a realidade brasileira nos últimos 30 anos (BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011; GOMBERT e MARIS, 2015).

O processo *Melle-boinot* (Figura 5) se caracteriza pela utilização de alta densidade celular de 10-17 % (m/v), período fermentativo de 6 a 12 horas, concentração final de etanol de 7 a 11 % (v/v), temperatura de 32-35 °C, reuso celular e tratamento ácido ao término de cada ciclo fermentativo (controle da contaminação bacteriana) (BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011; GOMBERT e MARIS, 2015).

Figura 5. Processo Melle-boinot de fermentação



Fonte: Adaptado de AMORIM et al., 2011

*S. cerevisiae* é atualmente a levedura amplamente utilizada na fermentação 1G, uma vez que apresenta produção de bioetanol em anaerobiose, rendimentos próximos ao estequiométrico (0,51 g de bioetanol por g de açúcar consumido) e alta tolerância à inibidores e à pressão osmótica, contudo, não converte naturalmente xilose em bioetanol (HAHN-HÄGERDAS et al., 2007; GOMBERT e MARIS, 2015; SU, WILLIS, JEFRIES, 2015). Essa conversão é de grande interesse no processo fermentativo 2G para a diminuição de custos de capital e operação, pois 33 % dos açúcares gerados na etapa de hidrólise são proveniente da xilana (polímero formado por xilose) (PARACHIN; ALMEIDA, 2013).

Um grande número de leveduras é capaz de consumir naturalmente xilose e arabinose, entretanto, apenas 1 % aproximadamente possuem a capacidade de converter xilose em bioetanol (HAHN-HÄGERDAS et al., 2007).

*Scheffersomyces stipitis* (anteriormente *Pichia stipitis*) e *Scheffersomyces shehatae* (anteriormente *Candida shehatae*) são exemplos dessas leveduras. Um dos maiores desafios na utilização industrial dessas leveduras é o controle do fornecimento de oxigênio dissolvido, necessário para a maximização da produção de bioetanol e consumo de xilose. Altas concentrações de oxigênio resultam em crescimento celular e baixa produção de bioetanol, enquanto que oxigênio insuficiente tem como consequência baixas velocidades de consumo de xilose e acúmulo de xilitol. Outro fator negativo é a incapacidade de realizar simultaneamente

o consumo de glicose e xilose, devido à repressão do gene de assimilação de xilose na presença de glicose (LONG et al, 2012; SU, WILLIS e JEFFRIES, 2015).

Em leveduras naturalmente fermentadoras de xilose a conversão desse açúcar (Figura 6) inicia-se pela redução da xilose em xilitol pela enzima xilose redutase (XR), seguida pela oxidação do xilitol em xilulose através da enzima xilitol desidrogenase (XDH). Para a entrada na via pentose fosfato, a xilulose é fosforilada e convertida em xilulose-5-fosfato, onde nesta via é convertido em gliceraldeído-3-fosfato e reduzido para etanol. Para isso, as enzimas envolvidas requerem cofatores, em que XR na maioria dessas leveduras possui especificidade dupla de cofator, NADPH ou NADH, existindo normalmente preferência por NADPH. A enzima XDH possui um único cofator  $\text{NAD}^+$ , que em concentrações insuficientes resulta em acúmulo de xilitol e bloqueio do metabolismo de xilose. Um modo de regenerar  $\text{NAD}^+$  por meio do NADH é o fornecimento controlado de oxigênio, contudo, em processos industriais existe uma grande dificuldade e um alto custo (HOU, 2012; KWAK e JIN, 2017).



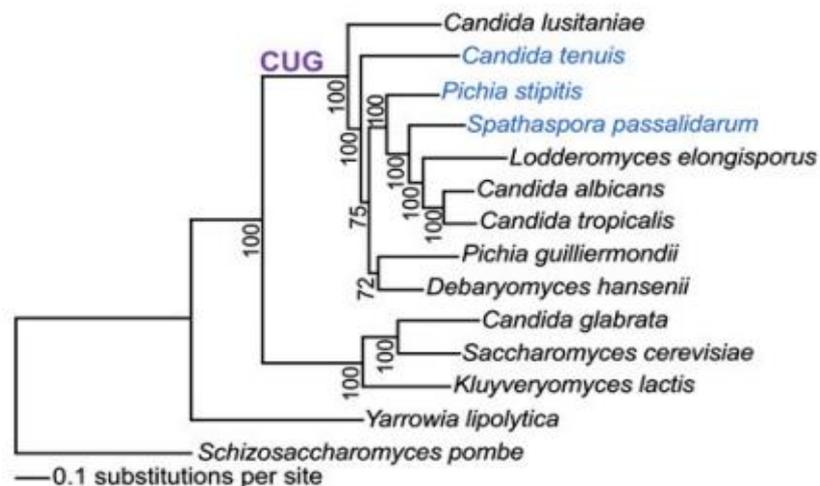
### 2.3. *Spathaspora passalidarum*

O gênero *Spathaspora* foi proposto por Nguyen et al. (2006) para acomodar a espécie *S. passalidarum*, uma levedura naturalmente fermentadora de xilose isolada do interior de besouros pertencentes à família Passalidae (BARBOSA et al., 2009; LIMA et al., 2015).

A literatura disponível descreve que essa levedura é capaz de assimilar simultaneamente xilose e glicose em aerobiose, metabolizar xilose tão rapidamente quanto glicose em meio composto por esses açúcares individualmente e co-fermentar glicose, xilose e celobiose em condição de limitação de oxigênio (LONG et al., 2012). *S. passalidarum* apresenta maior consumo de xilose e conversão em bioetanol na condição de anaerobiose em comparação com *S. stipitis*, levedura amplamente estudada para consumo de xilose (VERAS et al., 2017; ACEVEDO, CONEJEROS, AROCA, 2017). O consumo simultâneo de glicose e xilose precisa ser melhor estudado, uma vez que esta característica está associada a linhagem estudada.

*S. passalidarum* e *S. stipitis* são relacionados em perspectiva ambiental e taxonomicamente (Figura 7). Ambas as leveduras são encontradas no intestino de larvas e besouros adultos e pertencem ao clado “CUG” de leveduras que substituem a serina por leucina quando se encontra um CUG em seu RNA mensageiro (SU, WILLIS e JEFFRIES, 2015).

Figura 7. Filogenia de máxima probabilidade de concatenação de alinhamento de 136 genes ortólogos universais, com valores de bootstrap



Fonte: WOHLBACH et al., 2011

Acredita-se que as características de *S. passalidarum* estão associadas a sua evolução em ambiente de limitação de oxigênio e disponibilidade de açúcares celulósico e hemicelulósico (SU, WILLIS e JEFFRIES, 2015). O melhor desempenho dessa levedura na conversão de xilose à bioetanol em anaerobiose em relação à *S. stipitis* pode estar associada com a preferência da

enzima XR pelo co-fator NADH (enquanto que em *S. stipitis* a preferência é por NADPH), que satisfaz o  $\text{NAD}^+$  requerido pela enzima XDH através da reoxidação de NADH (HOU, 2012; LONG et al., 2012). Em análises de atividade enzimática, XR de *S. passalidarum* apresentou 1,8 vezes mais afinidade por NADH do que NADPH, enquanto que XR de *S. stipitis* apresentou 1,6 mais afinidade por NADPH do que NADH (HOU, 2012).

Hou (2012) realizou o estudo de consumo de xilose em anaerobiose (ensaio em frasco de anaerobiose) e em aeróbiose (*erlenmeyers* com tampão de algodão e agitação de 120 rpm). Em aerobiose demonstrou-se que *S. passalidarum* MYA-4335 é capaz de crescer e produzir bioetanol com uma única fonte de carbono (glicose ou xilose) e possui consumo simultâneo de glicose e xilose em uma mistura desses açúcares. Em anaerobiose verificou-se que é necessário que a glicose esgote para o início do consumo de xilose e tem-se melhor crescimento celular em meio composto unicamente por glicose, porém se obtém mais bioetanol em meio composto por xilose.

Resultados semelhantes foram obtidos por Long et al. (2012) ao realizar o estudo da fermentação simultânea de glicose, xilose e celobiose por *S. passalidarum* NRRL Y-27907. Em experimentos em aerobiose (injeção de 0,1 volume de ar por volume de meio (vvm) e 700 rpm) verificou-se que o crescimento celular pode ser até 20% maior em glicose do que xilose, sendo todo o açúcar consumido destinado a produção celular, não havendo produção de etanol. Em fermentações anaeróbicas (inicialmente 2,1 % de oxigênio saturado e injeção 90:10 nitrogênio:ar) obteve-se três vezes mais bioetanol em meio composto unicamente por xilose.

O efeito da aeração na produção de bioetanol por *S. passalidarum* NRRL Y-27907 foi estudo por Su et al. (2015) e nesse trabalho verificou-se que o aumento do oxigênio dissolvido no meio de fermentação resulta em decréscimo de produção de bioetanol. Esse resultado pode ser justificado pelo fato dessa levedura ser Crabtree negativa, e necessitar de limitação em  $\text{O}_2$  para desviar o metabolismo para a produção de etanol. Vale ressaltar que nos trabalhos descritos acima (HOU, 2012; LONG et al., 2012 e SU, WILLIS e JEFFRIES, 2015) os termos aerobiose e anaerobiose são tratados de forma distinta entre si, o que dificulta a comparação. No nosso conhecimento a condição de anaerobiose é referente à inexistência de  $\text{O}_2$  no sistema de fermentação no momento da inoculação (necessidade de injeção de  $\text{N}_2$  previamente à inoculação) e aerobiose é referente à um sistema em que existe frequente alimentação de  $\text{O}_2$  dissolvido no sistema.

Outro trabalho que deve ser destacado é o realizado por Nakanishi et al (2017). Fermentações em hidrolisado lignocelulósico obtido por meio de pré-tratamento alcalino

seguido de hidrólise enzimática em alta concentração de *S. passalidarum* NRRL Y-27907, reuso de células e decréscimo de temperatura ao passar dos ciclos celulares foram realizados. As estratégias adotadas resultaram em redução do tempo de consumo dos açúcares (glicose e xilose) de 40 h para 25 h e conversão simultânea de glicose e xilose na temperatura de 27°C em fermentações sem controle de oxigênio.

Na Tabela 2, é apresentada uma síntese dos parâmetros fermentativos dispostos na literatura para a *S. passalidarum*.

Tabela 2. Resumo de parâmetros cinéticos de fermentações com *S. passalidarum* obtidos a partir de dados da literatura: Produtividade volumétrica de etanol (Qe) (g.L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>), fator de conversão de substrato em etanol (Yet/s) (g.g<sup>-1</sup>), etanol título (g.L<sup>-1</sup>).

Cepa	Sistema	Concentração de Oxigênio (O <sub>2</sub> )	Meio fermentativo	Concentração inicial de açúcares (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Qe (g.L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )	Yet/s (g.g <sup>-1</sup> )	Etanol Título (g.L <sup>-1</sup> )	Fonte
MYA- 4335	Frasco anaeróbico	Anaerobiose	Sintético	Glicose (30) Xilose (30)	95	0,31	0,48	29	Hou (2012)
MYA- 4335	<i>Erlenmeyer</i>	Aerobiose	Sintético	Glicose (30) Xilose (30)	24	1,04	0,42	25	Hou (2012)
Y-27907	Bioreator	Limitação de O <sub>2</sub> (2,1 %)	Sintético	Glicose (100)	36	0,72	0,31	36	Long et al. (2012)
Y-27907	Bioreator	Limitação de O <sub>2</sub> (2,1 %)	Sintético	Xilose (90)	36	1,14	0,41	36	Long et al. (2012)
Y-27907	<i>Erlenmeyer</i>	2,47 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Sintético	Glicose (120) Xilose (30)	48	0,65	0,43	31	Su et al., (2015)
CBS 10155 <sup>T</sup>	<i>Erlenmeyer</i>	1-2 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	Sintético	Xilose (50)	24	0,85	0,48	21	Cadete et al., (2016)
CBS 10155 <sup>T</sup>	<i>Erlenmeyer</i>	10-15 mmolO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	Sintético	Xilose (50)	18	1,12	0,48	20	Cadete et al., (2016)
Y-27907	Bioreator	Limitação de O <sub>2</sub>	Sintético	Xilose (40)	55	0,30	0,45	16	Veras et al., (2017)
Y-27907	Frasco Anaeróbico	Anaerobiose	Sintético	Xilose (40)	120	0,04	0,16	5	Veras et al., (2017)
Y-27907	Bioreator	Sem controle	Licor alcalino	Glicose (48) Xilose (12)	40	0,28	0,32	20,9	Nakanishi et al., (2017)
Y-27907	<i>Erlenmeyer</i>	Microaerofilia	Auto hidrolisado de Eucalipto	Glicose (80) Xilose (12)	120	0,09	0,22	11	Morales et al. (2017)
Y-27907 Evoluída	<i>Erlenmeyer</i>	Microaerofilia	Auto hidrolisado de Eucalipto	Glicose (80) Xilose (12)	120	0,55	0,36	66	Morales et al. (2017)

## 2.4. Contaminação bacteriana

A natureza do processo *Melle boinot* nas usina 1G no Brasil, que é caracterizado pelo processamento em larga escala (tanques de 0,5 a 3 milhões de litros) e pelo reuso de célula, resulta na impossibilidade de obtenção de condições assépticas e na propagação de microrganismo contaminantes pelo reuso celular. Nessas condições, os microrganismos contaminantes predominantes são as bactérias, o que tem como consequência a diminuição do rendimento fermentativo, floculação das células de levedura e perda de viabilidade celular (OLIVA-NETTO e YOKOYA, 1994; AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2014).

Em dornas de fermentação a contaminação pode ocorrer de dois modos distintos: diretamente ou indiretamente. No modo direto, os microrganismos contaminantes são provenientes de materiais adicionados ao fermentador, como mosto, inóculo ou através da formação de aerossóis. No modo indireto, os microrganismos contaminantes encontram-se nas linhas de transferência ou de água (MUTHAIYAN, LIMAYEM, RICKE, 2011).

Economicamente, contaminações bacterianas em valores superiores a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> representam prejuízos, por causa da diminuição do rendimento alcoólico em função do desvio da fonte de carbono para crescimento e manutenção dos contaminantes. Estima-se que essa perda pode variar de 1 a 5% na eficiência fermentativa, o que pode corresponder a aproximadamente 20.000 litros de bioetanol ao dia que não são produzidos pelas destilarias brasileiras (AMORIM et al., 2011)

Dentre os gêneros de bactérias gram-positivas e gram-negativas isoladas do processo estão *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Bacillus*. Devido ao rápido crescimento e à tolerância a altas temperaturas (30-45°C), baixo pH e altas concentrações de bioetanol, o principal contaminante encontrado nas usinas sucroalcooleiras são as bactérias ácido lácticas (BAL) (BISCHOFF et al., 2009; BREXÓ e SANT'ANA, 2017). Estima-se que nas dornas brasileiras encontram-se valores entre  $6,0 \times 10^5$  a  $8,9 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo que majoritariamente pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (LUCENA et al., 2010).

Essa informação foi confirmada por Bonatelli et al (2017) ao realizar o estudo de dornas de fermentação de etanol 1G em processo batelada alimentada e contínuo. Em ambos os processos foram encontrados mais de 35 gêneros de bactérias, sendo que pelo sequenciamento 16s rDNA se verificou que 92-99 % das bactérias são pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

Metabolicamente as BAL (Bactérias Ácido Lácticas) podem ser classificadas em: homofermentativas ou heterofermentativas. As BAL homofermentativas são caracterizadas por

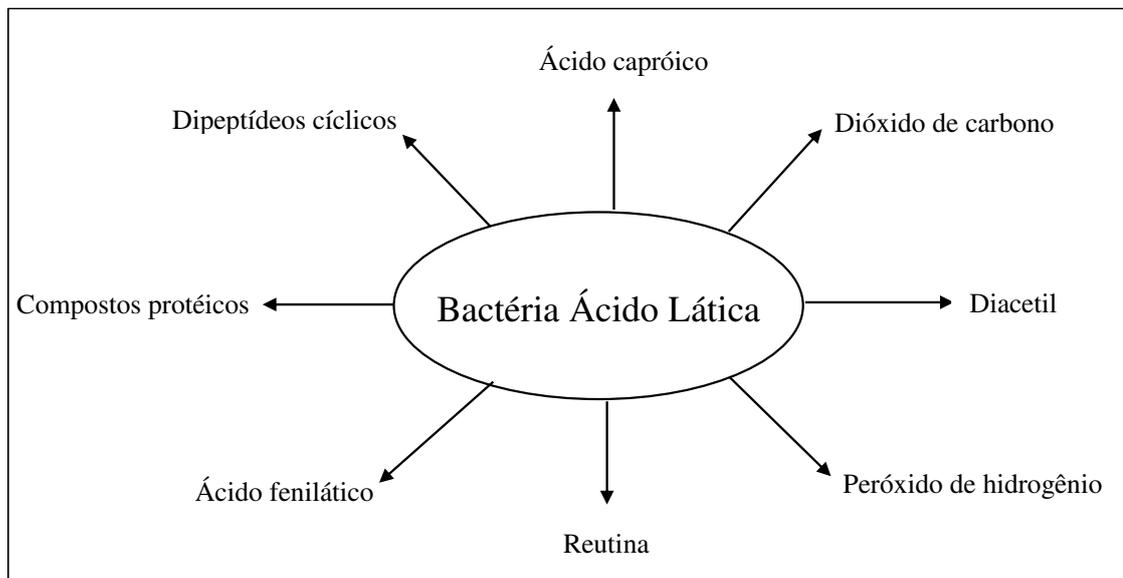
realizar a assimilação de hexoses através da via glicolítica, onde 1 mol de hexoses resulta na formação de 2 mols de ácido láctico e 2 mols de ATP. As BAL heterofermentativas caracterizam-se pela conversão de hexoses em ácido láctico, etanol, acetato e dióxido de carbono, com produção de 1 ATP. Apesar dessa divisão, isolados de BAL provenientes de processos industriais apresentaram ambas as características (BASSO et al, 2014).

O efeito da contaminação por BAL em processos fermentativos está relacionado com o seu metabolismo. Uma vez que existe competição por nutrientes entre a bactéria e levedura e produção de ácidos orgânicos (ácido láctico e/ou ácido acético) pela bactéria (BECKNER, IVEY E PHISTER; 2011, ROACH et al.; 2013).

O acúmulo de ácidos orgânicos é descrito como o fator com maior impacto nos processos fermentativos, em razão de serem capazes de permear a membrana celular e dissociar em  $H^+$ , resultando na acidificação do citoplasma celular. Entretanto outros compostos podem estar associados ao processo inibitório (Figura 8), como diacetil, reuterina e compostos proteicos (BECKNER, IVEY E PHISTER; 2011, ROACH et al.; 2013).

Diacetil é um composto produzido por BAL que inibe leveduras e bactérias gram-positivas, em concentrações superiores à  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  tem efeito inibitório sobre *Candida lipolytica*, *Deboryomyces cantarelli* e *Rhodototula tubra*. Reutina é um produto intermediário do metabolismo de glicerol por BAL, esse composto é um antibiótico que atua contra diferentes microrganismos como bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, especialmente do gêneros: *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Compostos proteicos também estão associados à inibição do desenvolvimento de leveduras, um exemplo é um peptídeo de cadeia média produzido por *Lactobacillus pentosus* que possui efeito fungicida contra *Candida albicans* e um peptídeo de cadeia curta e termicamente estável produzido *Lactobacillus corynidormis* que apresenta efeito antifúngico sobre leveduras e bolores. O efeito antifúngico também foi verificado para um ácido graxo hidroxilado produzido por *Lactobacillus plantarum* que possui efeito inibitório em leveduras na concentração de  $10\text{-}100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (BECKNER, IVEY E PHISTER; 2011)

Figura 8. Sumário de compostos produzido por diferentes BAL.



Fonte: BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011.

A floculação é outro fator associado com a diminuição do rendimento fermentativo, pois pode ser associada com a produção de gomas, ácidos e toxinas, tendo como consequência a diminuição da viabilidade celular e dificuldades no processo de centrifugação, o que resulta em sedimentação e acúmulo no fundo das dornas (CARVALHO-NETTO et al., 2015; BREXÓ e SANT' ANA, 2017).

Leveduras podem apresentar naturalmente característica floculante quando apresentam os genes da família FLO e seus reguladores transcricionais. No entanto, em processos industriais, apesar da utilização de leveduras não-floculantes, verifica-se a presença de fermentações com essa característica, nesse caso estando relacionada com co-agregação entre bactéria e levedura (CARVALHO- NETTO et al., 2015).

*Lactobacillus* são importantes para a indução da floculação das leveduras, especialmente *Lactobacillus fermentum*, frequentemente isoladas de cubas floculadas. Do ponto de vista ecológico, a capacidade de induzir a floculação resulta, para as leveduras, em dificuldade de crescimento e absorção dos nutrientes presentes, o que permite o estabelecimento das bactérias (BREXÓ e SANT' ANA, 2017).

Com o objetivo de controlar a contaminação bacteriana e seus efeitos em fermentações industriais, diferentes estratégias são adotadas pelas usinas sucroalcooleiras. Dentre elas estão a aplicação de tratamento ácido, antibióticos, derivados de lúpulo e biocidas químicos (AMORIM et al, 2011).

A etapa de tratamento ácido do creme de leveduras, resultante da centrifugação do vinho ao término da fermentação, é incorporada ao processo *Melle-boinot* como uma estratégia para o controle da contaminação e diminuição da floculação causada por bactérias. Esse tratamento consiste em lavagens das células com ácido sulfúrico diluído em um pH de 1,8 a 2,5 pelo período de 2 a 3 horas antes do início de um novo ciclo fermentativo (WHEALS et al., 1999; AMORIM et al., 2011).

Outra alternativa para conter a contaminação em processos 1G é o uso de antibióticos como a penicilina, estreptomicina, tetraciclina, virginiamicina, monesina ou uma mistura destes. Entretanto, a utilização desses antibióticos representa um aumento de custo para o processo e é uma questão de saúde pública, uma vez que resíduos desses antibióticos podem ser vinculados na levedura seca e vinhaça, que são utilizados respectivamente na produção de produtos para alimentação animal e como fonte de nutriente para o solo na produção de cana-de-açúcar. A utilização desses antibióticos está associada com aumento de bactérias resistentes a esses compostos (MUTHAIYAN e RICKE; 2010; COSTA et al., 2018), principalmente no solo, uma vez que a vinhaça é utilizada para irrigar as plantações de cana.

Para a produção de bioetanol de segunda geração os trabalhos disponíveis sobre contaminação bacteriana são escassos. Têm-se como trabalhos disponíveis na literatura os desenvolvidos por Schell et al (2007) e Albers et al (2011). Em ambos os trabalhos, *S. cerevisiae* foi utilizada como levedura produtora de etanol, sendo *S. cerevisiae* L1400 e *S. cerevisiae* LNH-ST (geneticamente modificada –OGM) utilizada por Schell et al (2007) e *S. cerevisiae* CCUG53310 utilizada por Albers et al (2011). Schell et al (2007) verificaram que em escala piloto para a produção de bioetanol de palha de milho (pré-tratamento ácido), foram requeridas seis semanas para o aparecimento da contaminação, sendo isoladas as espécies *L. brevis* e *L. plantarum*. Albers et al (2011) observaram que em hidrolisado obtido de madeira, as bactérias desenvolveram-se apenas na presença da levedura e bactérias da espécie *Acetobacter* causam mais danos para o processo do que espécies de *Lactobacillus*. Nesse trabalho isolou-se *L. buchneri*, *L. plantarum* e bactérias da espécie *Acetobacter* e utilizou-se *L. fermentum* como controle.

## **2.5. *Lactobacillus fermentum***

*L. fermentum* é uma bactéria Gram-positiva encontrada em diferentes habitats, como alimentos naturalmente fermentados e na microflora humana. Assim como outras bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, essa bactéria caracteriza-se por ser anaeróbica

facultativa, catalase-negativa, não formadora de esporos (GOLDSTEIN, TYRELL, CITRON, 2015; ZHANG et al., 2016).

Nas usinas de bioetanol 1G, *L. fermentum* é um dos principais contaminantes e possui alta resistência ao processo (LUCENA et al., 2010). As consequências da contaminação por *L. fermentum* em fermentações alcoólicas são muito bem conhecidas e descritas na literatura. A presença dessa bactéria em dornas de produção de etanol está relacionada com a co-agregação celular (CARVELHO-NETTO et al., 2015), alta produção de ácidos orgânicos e decréscimo na produção de etanol (REIS et al., 2018).

Basso et al. (2014) realizaram o estudo comparativo do efeito da contaminação por *L. plantarum* (FT-025B, homofermentativa) e *L. fermentum* (FT-230B, heterofermentativa) em fermentação em mosto composto de melaço e caldo de cana nas condições do processo 1G. Os autores verificaram que *L. fermentum* possui maior impacto sobre o processo fermentativo do que *L. plantarum*, o que pode ser justificado pelo sucesso de *L. fermentum* em competir com a levedura pelos nutrientes.

Costa et al (2018) estudaram o efeito do tratamento ácido sobre *L. fermentum* em fermentação 1G. Nesse trabalho, os autores verificaram que o tratamento ácido é efetivo no controle da população dessa bactéria, uma vez que reduz em 4 ciclos decimais as unidades formadoras de colônia viáveis (aproximadamente de  $10^{10}$  para  $10^6$ , em cultura pura). Entretanto, utilizando a condição do processo 1G, tratamento com ácido sulfúrico em pH 2,0 por 2 h, não se verifica a completa eliminação dessa bactéria.

## 2.6. Secretoma de microrganismos

Conforme Greenbaum et al. (2001), proteoma pode ser definido como as regiões codificantes de proteínas no genoma. Parte considerável dessas proteínas são classificadas como secretoma, que consistem em proteínas secretadas pela célula, ancoradas na parede celular ou envolvidas na via de secreção (HUANG et al., 2011).

Secreção de proteínas é um importante processo, tanto para células procariontes, como para células eucariontes, uma vez que incluem fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, fatores de coagulação, proteínas de matriz extracelular, proteases e inibidores. Além disso, é descrito pela literatura que essas proteínas possuem importante papel na atividade extracelular, incluindo comunicação célula-célula, interação célula-matriz e resposta imune celular (GIARDINA, SRANLEY, CHIANG, 2014; SMEEKENS, XIAO, WU, 2017).

Em bactérias a secreção de proteínas está relacionada com a comunicação molecular entre bactéria-hospedeiro e pode ser utilizada como forma de monitorar o desenvolvimento

bacteriano. Em fungos de parede celular espessa a secreção de proteínas é responsável pela formação e manutenção da parede celular, separação celular e obtenção de nutrientes (SÁNCHEZ et al., 2009; GIARDINA, SRANLEY, CHIANG, 2014).

A secreção de proteínas pode ocorrer através de via metabólica clássica e não clássica. Na via clássica as proteínas apresentam um peptídeo sinal específico N-terminal que é responsável por direcionar as proteínas através do sistema de secreção. A secreção de enzimas e proteínas com ausência desse sinal é classificada como não clássica, e inclui enzimas metabólicas, fatores de translação e reguladores transcricionais (GIARDINA, SRANLEY, CHIANG, 2014).

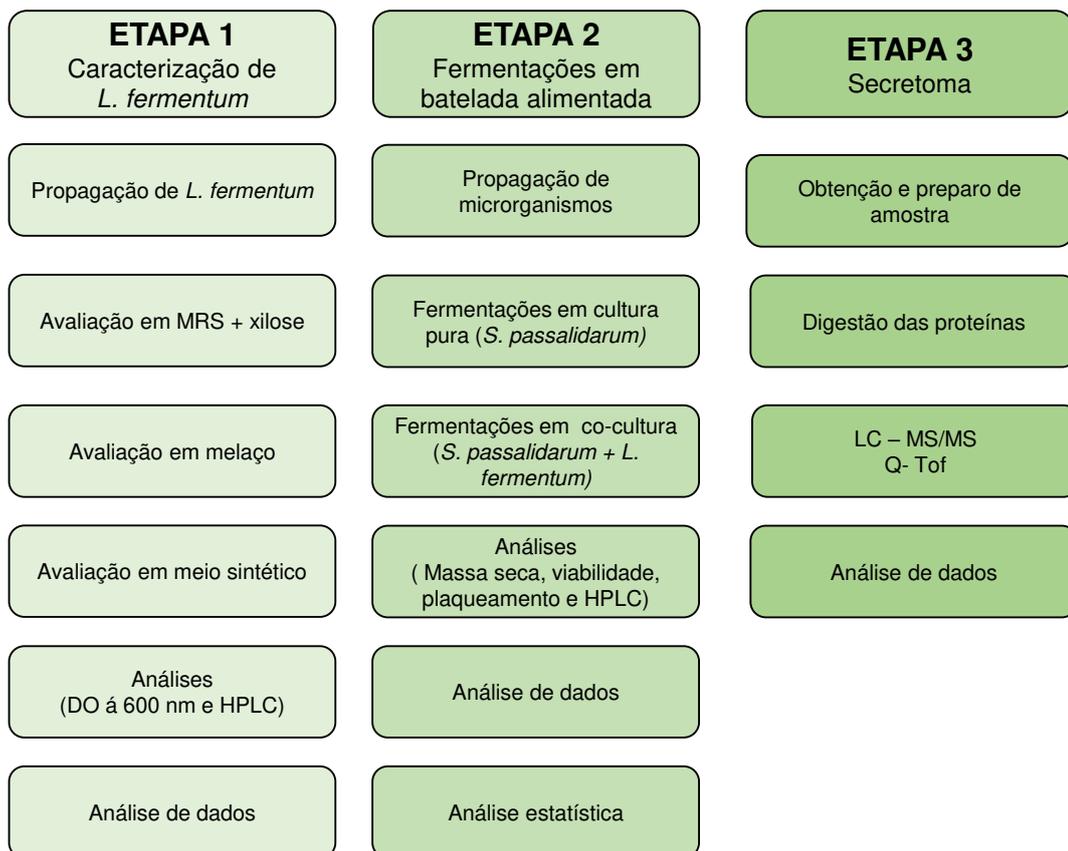
Poucos secretomas de leveduras e fungos filamentosos foram analisados experimentalmente. Análises computacionais de genomas de leveduras estimam que em média 200 proteínas podem ser potencialmente excretadas por um único indivíduo (MATTANOVICH et al., 2009). Cortázar et al. (2014) estimaram o secretoma de 70 fungos através do SECRETOOL (<http://genomics.cicbiogune.es/SECRETOOL/Secretool.php>), uma ferramenta disponível gratuitamente na internet, que realiza a determinação do secretoma através de uma sequência de aminoácidos. Para a *S. passalidarum* NRRL Y-27907, com um genoma com tamanho 13.182.099 bp, os autores estimaram que essa levedura tem o potencial de secretar 100 proteínas.

Tendo em vista o modelo de processo utilizado em mais de 80% das destilarias nacionais (Melle Boinot com reciclo de células e tratamento ácido), conhecer ou estimar as proteínas excretadas durante o processo (tanto por leveduras quanto bactérias) pode fornecer subsídios para o controle da contaminação. É sabido que BAL necessitam de grandes quantidades de bases nitrogenadas (purina e pirimidinas) e aminoácidos para o crescimento (FITZPATRICK e O'KEEFFE; 2001), enquanto que leveduras *Spathaspora* possuem poucas exigências nutricionais para o crescimento (LONG et al.; 2012, NAKANISHI et al.; 2017). Verificar se estes nutrientes estão sendo potencializados pela lise de leveduras durante os reciclos ou o tratamento ácido ou se estão sendo eliminadas no processo de centrifugação é de extrema importância para o conhecimento profundo do sistema fermentativo estudado neste trabalho.

### CAPÍTULO 3- METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Esse capítulo apresenta os materiais e as métodos utilizados para o desenvolvimento desse trabalho. As análises foram divididas em três etapas: 1) Caracterização de *L. fermentum*; 2) Fermentações em batelada alimentada com reuso celular e 3) Secretoma de fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). As etapas 1 e 2 foram realizadas utilizando as estruturas do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioetanol (CTBE) e a etapa 3 foi realizada no Laboratório Nacional de Biociência (LNBIO). Ambos os laboratórios são pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM/ MCTI). Na Figura 9, apresenta-se um fluxograma descritivo com as análises realizadas em cada etapa.

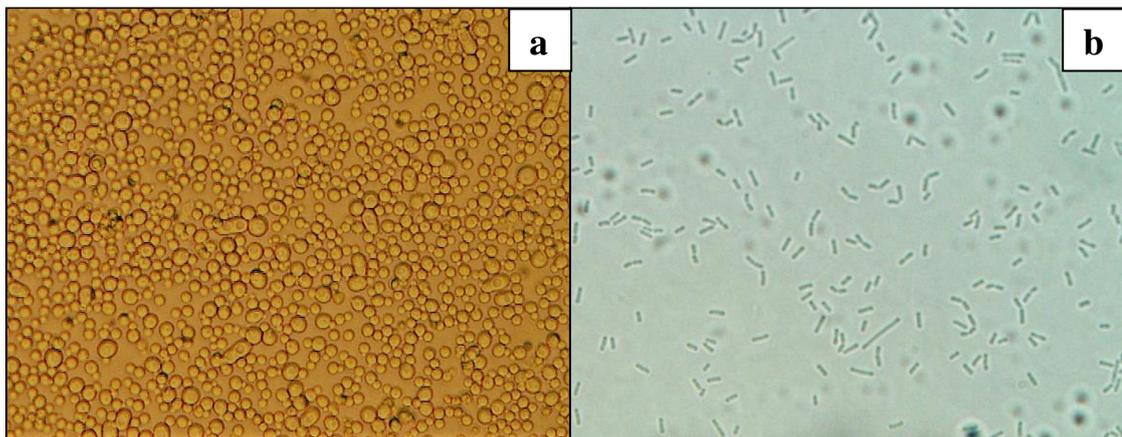
Figura 9. Fluxograma descritivo dos experimentos e das análises em cada etapa do projeto



### 3.1. Microrganismos

*S. passalidarum* NRRL Y- 27907 (Coleção de cultura do serviço de pesquisa agrícola, Centro Nacional para pesquisa e utilização agrícola, Ilinóis, Estados Unidos da América) e *L. fermentum* I2 (Zimotec, Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brasil) foram os microrganismos utilizados nesse projeto de pesquisa (Figura 10). *S. passalidarum* NRRL Y-27907 foi utilizada uma vez que é uma levedura naturalmente fermentadora de xilose e essa linhagem é amplamente estudada na literatura. *L. fermentum* I2 foi utilizado uma vez que é uma BAL isolada de uma dorna de fermentação do processo 1G. Ambos os microrganismos foram armazenados a -80 °C em estoque de glicerol 50 % (v.v<sup>-1</sup>).

Figura 10. Microrganismos utilizados nesse projeto (imagem obtida em microscópio óptico). a) *S. passalidarum* (40 x) e b) *L. fermentum* (100 x).



Fonte: Do autor

### 3.2. Propagação dos Microrganismos

#### 3.2.1. *S. passalidarum* NRRLY- 27907

A propagação de *S. passalidarum* NRRLY- 27907 foi realizada conforme metodologia descrita por Nakanishi et al (2017). Para isso realizaram-se três etapas: pré-inóculo, inóculo e propagação.

A etapa de pré-inóculo consistiu na reativação da levedura pela adição de 1 mL da cepa estoque em um *erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio estéril composto por (g.L<sup>-1</sup>): peptona (20), extrato de levedura (10), xilose (20). O *erlenmeyer* foi incubado em *shaker* por 24 h a 30 °C e 200 rpm.

Em seguida, o inóculo foi preparado através da adição de 25 mL do pré-inóculo em um *erlenmeyer* de 1 L contendo 250 mL de meio estéril composto por (g.L<sup>-1</sup>): extrato de levedura

(3), ureia (2,3), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) (1,0), xilose (12), glicose (1,32). O inóculo foi incubado nas mesmas condições descritas acima por 15 horas.

A etapa de propagação foi realizada em um biorreator de 3 L (Bioflo 115, New Brunswick, NJ) com volume útil de 1,8 L e porcentagem de oxigênio dissolvido mantido entre 40 a 50% em relação a saturação com ar atmosférico e temperatura de 30 °C. Essa etapa consistiu de: batelada, pulso, batelada alimentada.

A primeira etapa da propagação consistiu de um processo em modo batelada em que 150 mL do inóculo foi adicionado no biorreator contendo 1,250 L de meio estéril composto por ( $\text{g.L}^{-1}$ ): melaço de cana-de-açúcar (30 ART), fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (2,0) e ureia (5,0). O biorreator utilizado nessa etapa foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 45 min com água suficiente para diluir o melaço.

Um pulso de 163 mL composto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0) e ureia (5,0) foi realizado no tempo de 10-11 horas (tempo aproximado para o consumo total dos açúcares, monitorada por FT-MIR (*Fourier transform mid-infrared spectroscopy*)). Em seguida, a alimentação de melaço de cana-de-açúcar com vazão de 3 g  $\text{ART.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  foi estabelecida. Após 18 horas de alimentação, a propagação foi finalizada e o vinho foi centrifugado de forma estéril a 15860  $\times\text{g}$  durante 20 min. A massa de células obtida foi ressuspensa em água destilada estéril e armazenada em geladeira por no máximo 72 h até o início da fermentação.

### 3.2.2. Propagação *L. fermentum* I2

*Lactobacillus fermentum* I2 foi utilizado nesse trabalho para o estudo de co-cultivo com a levedura *S. passalidarum* NRRLY- 27907. *L. fermentum* I2 foi gentilmente cedida pelo Prof. Luiz Carlos Basso (ESALQ-USP) ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE-CNPEN).

A propagação do *L. fermentum* I2 foi realizada conforme metodologia descrita por Lucas Lopes (dados não publicados). Para isso, utilizando uma alça estéril estriou-se em placas com MRS (Difco, EUA, Detroit) a cepa estoque e armazenaram-se as placas em estufa por 48 horas a 30 °C.

Partindo da placa inoculada, o pré-inóculo foi obtido pela transferência de três colônias para 100 mL de MRS em *erlenmeyer* de 150 mL. O estriamento em placa e o pré-inóculo foram feitos em duplicata. Os *erlemeyers* contendo o pré-inóculo foram incubados em *shaker* a 30 °C, 50 rpm por 10 h. Em seguida, o inóculo foi obtido pela transferência de 4 mL do pré-inóculo para um *erlenmeyer* de 500 mL contendo 396 mL de MRS (10 % de pré-inóculo), o frasco foi incubado em *shaker* a 30 °C e 50 rpm por 15 h.

Ao final desse tempo o volume requerido para a obtenção da concentração de  $10^8$  UFC de *L. fermentum*/ mL foi centrifugado a  $3100\times g$  e  $4\text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min em centrífuga eppendorf®. O *pellet* de célula obtido foi ressuspensionado em solução salina. O volume de inóculo a ser centrifugado foi determinado conforme a curva de D.O (densidade óptica) a 600 nm versus UFC/mL obtido por Lucas Lopes (dados não publicados), em que  $10^8$  UFC/mL corresponde a 0,289 de D.O a 600 nm.

### 3.2. Caracterização do crescimento e consumo de açúcares por *L. fermentum* I2 em diferentes meios fermentativos.

A avaliação do crescimento e consumo de açúcares por *L. fermentum* I2 foi realizado em três meios distintos: MRS + xilose, Melaço e Meio sintético. O meio MRS + xilose foi obtido pela diluição do meio MRS da marca Difco seguido pela suplementação com xilose. Na Tabela 3, apresenta-se a composição dos meios analisados.

Tabela 3. Composição dos meios MRS + Xilose, Melaço e Meio Sintético utilizados para o estudo do crescimento e consumo de açúcares pelo *L. fermentum* I2.

MRS + Xilose	
Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
MRS (Man, Rogosa, Sharpe) (Difco, EUA, Detroit)*	35,0
Xilose	6,0
Glicose	14,0
Melaço	
Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Melaço (ART)	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0
Úreia	2,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Oligoelementos **	1,0 mL.L <sup>-1</sup>
Meio Sintético	
Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	14,0
Xilose	6,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0
Úreia	2,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Oligoelementos **	1,0 mL.L <sup>-1</sup>

\* Composição (g.L<sup>-1</sup>): Peptona proteose n° 3 (10); Extrato de carne (10); Extrato de levedura (5); Polissorbato 80 (1); Citrato de amônio (2); Acetato de sódio (5); Sulfato de magnésio (0,1); Sulfato de manganês (0,05); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2).

\*\* Composição (g.L<sup>-1</sup>): Ácido cítrico monohidratado (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) (5,00); Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (1,60); Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (0,05); Sulfato de manganês monohidratado (MgSO<sub>4</sub>) (0,05); Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) (0,05); Molibdato de sódio monohidratado (NaMoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (0,05) e Sulfato ferroso monohidratado (FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (1).

Em todos os meios analisados a concentração de açúcares totais foi equivalente a 20 g.L<sup>-1</sup>, em que MRS + Xilose e Meio sintético possuíam 14 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 6 g.L<sup>-1</sup> de xilose. A metodologia utilizada nesse experimento foi baseada no trabalho de Basso et al (2014) e Zhang et al (2016).

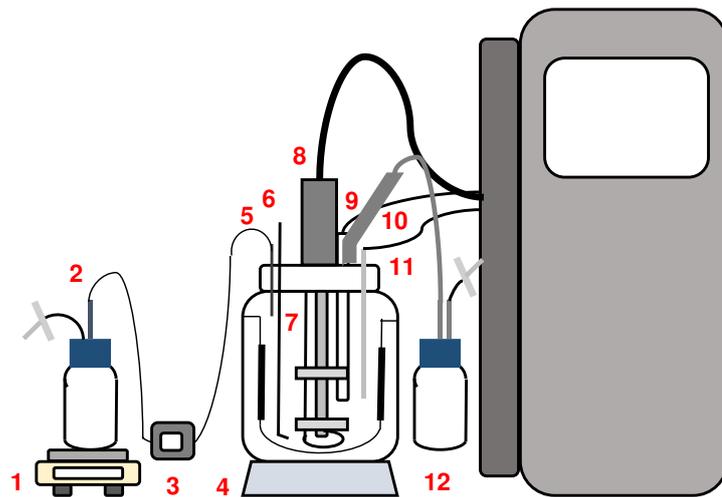
Uma alíquota da suspensão celular de *L. fermentum* I2 (item 3.2.2) suficiente para a obtenção de 10<sup>8</sup> UFC/ mL foi transferida para um *erlenmeyer* de 150 mL contendo 100 mL do meio a ser avaliado. Os *erlenmeyers* foram incubados a 30° C, 50 rpm por 48 h e as amostragens foram realizadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 24, 48 h. As amostras foram centrifugadas a 19090×g por 4,5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20 °C, para realização de análise de HPLC. O *pellet* de célula foi ressuscitado em água destilada e a D.O (densidade óptica) foi mensurada a 600 nm em espectrômetro óptico (Thermo Scientific®, Evolution 60s). Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3.3. Fermentações em batelada alimentada com reuso celular

O efeito da contaminação por *L. fermentum* I2 no processo fermentativo de *S. passalidarum* foi analisado em sistema que mimetiza o processo de fermentação 1G, para tanto fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*) utilizando sistema batelada alimentada com alta densidade, reuso celular e tratamento ácido foram realizadas.

As fermentações foram realizadas conforme metodologia adaptada de Nakanishi et al (2017). Para tanto, utilizou-se um biorreator Bioflo® 115 3L (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, NJ) (Figura 11) com volume útil de 1,5 L, sendo 1/3 (v/v) referente ao pé-de-cuba e 2/3 (v/v) ao meio de alimentação. Como condições de processo utilizou-se temperatura de 30 °C, agitação de 200 rpm e não foi realizado o controle e adição de oxigênio, o que resultou em uma anaerobiose natural devido à produção de CO<sub>2</sub>. Para cada condição realizou-se os experimentos em triplicata biológica e realizou-se 2 ciclos celulares (correspondente à 3 ciclos fermentativos)

Figura 11. Esquema representativo do sistema para a realização das fermentações em batelada alimentada. 1. Balança semi-analítica (Shimadzu® UX4200S); 2. Frasco de alimentação; 3. Bomba peristáltica; 4. Biorreator Bioflo® 3 L (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, NJ); 5. Alimentação; 6. Saída; 7. Entrada de oxigênio; 8. Agitador; 9. pHmetro; 10. Condensador; 11. Termômetro; 12. Trap.



Fonte: Do autor

Conforme citado anteriormente, dois tipos de sistema foram testados; o primeiro consistiu de fermentações com cultura pura de *S. passalidarum* e, o segundo, em fermentações da co-cultura de *S. passalidarum* e *L. fermentum*. Em ambas as condições no tempo inicial de fermentação adicionou-se ao biorreator o pé-de-cuba com volume equivalente à 0,5 L. Na condição de cultura pura o pé-de-cuba continha apenas *S. passalidarum* na concentração de 60 g.L<sup>-1</sup> (em base seca). Na condição de co-cultura, além da levedura adicionou-se *L. fermentum* I2 na concentração de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (com base no volume do pé-de-cuba). O biorreator foi previamente esterilizado com 0,8 L de solução salina em autoclave a 121 °C por 45 min, e essa solução foi drenada com o auxílio de uma bomba peristáltica antes da adição do pé-de-cuba.

Para a obtenção do pé-de-cuba determinou-se a concentração celular em base seca do creme de levedura ao término da propagação. Conhecendo-se esse valor, antes do início da fermentação calculou-se o volume requerido de creme de levedura para a obtenção de 30 g de célula seca. Esse volume foi transferido para uma caçapa estéril e centrifugado a 15860×g por 20 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em água destilada estéril até a obtenção de volume equivalente a 0,5 L. Para as fermentações em co-cultura com *L. fermentum* I2 adicionou-se uma solução de 10<sup>8</sup> UFC de bactéria.mL<sup>-1</sup> ao *pellet* obtido após a centrifugação e diluiu-se com água destilada até a obtenção do volume 0,5 L.

Após a adição do pé-de-cuba iniciou-se, a alimentação com o meio de fermentação (Tabela 4) com vazão de 0,067 L.h<sup>-1</sup> por 15 h. Ao término desse tempo estendeu-se a fermentação até o tempo total de 32 h com amostragem a cada 4 h.

Tabela 4. Composição do meio de alimentação das fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

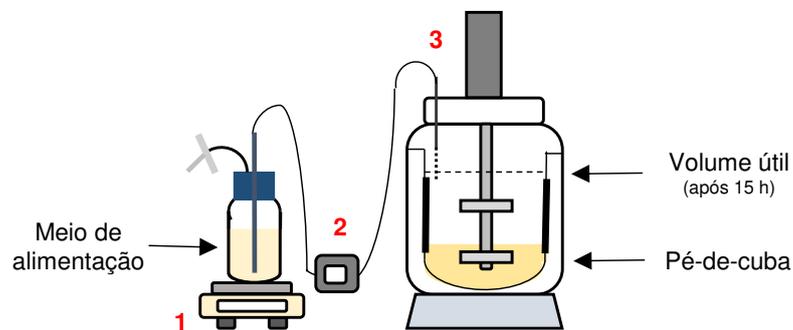
Nutriente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	63,0
Xilose	27,0
Ureia	3,6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,5
Oligoelementos*	1,5 (mL.L <sup>-1</sup> )

\*Composição (g.L<sup>-1</sup>): Ácido cítrico monohidratado (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) (5,00); Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) (1,60); Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (0,05); Sulfato de manganês monohidratado (MgSO<sub>4</sub>) (0,05); Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) (0,05); Molibdato de sódio monohidratado (NaMoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (0,05) e Sulfato ferroso monohidratado (FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (1).

A composição do meio de alimentação teve como base a razão glicose:xilose de um hidrolisado lignocelulósico obtido por pré-tratamento alcalino e a suplementação foi realizada conforme Long et al (2012). Nesse projeto não se adicionou extrato de levedura para a suplementação, diferentemente de Nakanishi et al (2017) e Santos et al (2016), uma vez que esse suplemento poderia interferir nas análises de secretoma.

Na Figura 12 apresenta-se um esquema do biorreator após o início da alimentação.

Figura 12. Esquema representativo do biorreator após o início da alimentação. 1. Balança semi-analítica, 2. Bomba peristáltica e 3. Biorreator



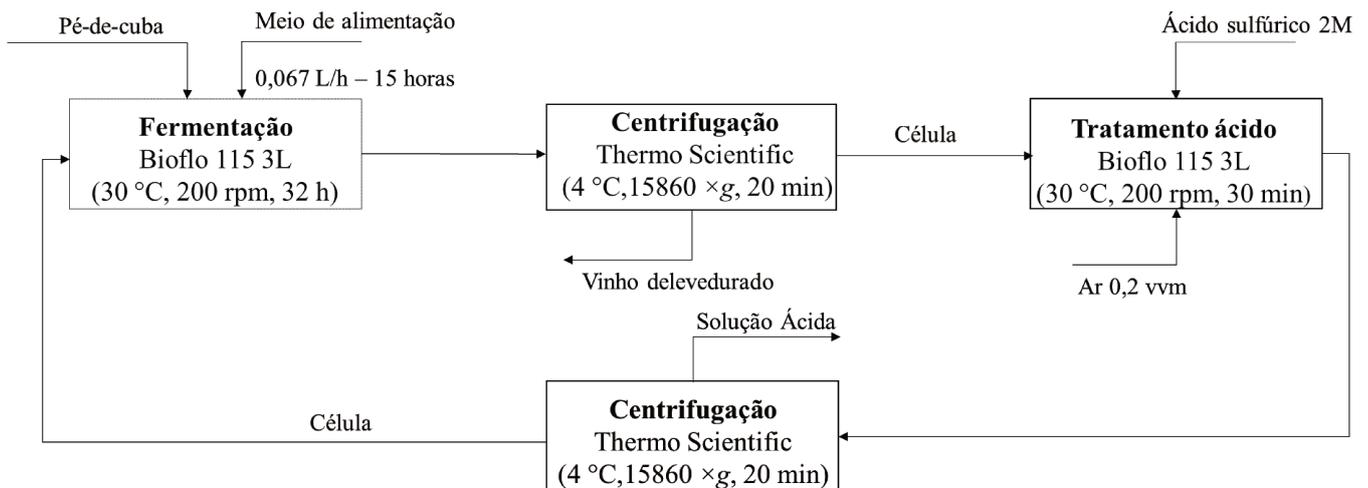
Fonte: Do autor

Ao passar 32 h, o vinho levedurado foi retirado de forma asséptica do biorreator e centrifugado a 15860×g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e a célula foi ressuspensa em 0,5 L de água destilada estéril e submetida ao tratamento ácido.

O tratamento ácido foi realizado pela adição de ácido sulfúrico 2M à suspensão celular até a obtenção de  $\text{pH } 2,5 \pm 0,5$ . Em seguida, realizou-se a transferência para o biorreator e utilizaram-se como condições:  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm e 0,2 vvm (volume de ar por volume de meio). A condição utilizada nesse projeto baseia-se no trabalho de Nakanishi et al (2017) e o tempo utilizado difere-se do tempo utilizado no processo 1G.

Após 30 min, o biorreator foi descarregado e o material foi centrifugado a  $15860\times g$  por 20 min. O sobrenadante foi descartado e a célula foi ressuspensa em água destilada até a obtenção de 0,5 L para a obtenção do pé-de-cuba. Essa etapa de centrifugação foi adicionada, uma vez a alimentação do meio não foi suficiente para aumentar o pH. O pé-de-cuba foi novamente adicionado ao biorreator, dando origem a um novo ciclo de fermentação (Figura 13). Esse procedimento foi realizado por mais 2 vezes em triplicata biológica.

Figura 13. Diagrama de blocos do processo fermentativo para cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).



Fonte: Do autor

### 3.4. Análises

#### 3.4.1. Determinação da concentração celular em massa seca

A determinação da massa de célula seca foi realizada através da adição de 1,5 mL de amostra (creme de levedura, pé-de-cuba ou vinho levedurado) em um criotubo de 2 mL previamente seco em estufa a  $80\text{ }^\circ\text{C}$  por 48 horas e pesado em balança analítica. Após a adição da amostra os microtubos foram centrifugados a  $19100\times g$  por 4,5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo criotubo e armazenado em freezer a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para posterior análise em

HPLC. Na fração sólida foram adicionados 1,5 mL de água destilada e realizou-se a ressuspensão do sólido com o auxílio de um vortex. O criotubo foi novamente centrifugado nas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e a fração sólida foi seca em estufa a 80 °C por 48 horas. Ao decorrer desse tempo, os criotubos foram transferidos para um dissecador até a obtenção de equilíbrio da temperatura com a ambiente e foram pesados em balança analítica. O cálculo da massa seca por litro foi realizado utilizando a Equação (1):

$$\text{Massa seca (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{M_{CS} - M_c}{V} \cdot 1000 \quad (1)$$

Onde: Msc = Massa seca do criotubo + célula (g); Mc= Massa seca do criotubo (g); V= Volume da amostra (mL).

### 3.4.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular da levedura foi determinada no início (0 horas) e ao término da fermentação (32 horas). Para isso, realizou-se a diluição da amostra (100 a 1000 vezes) com água destilada. Em seguida realizou-se a transferência de 900 µL de amostra diluída para um microtubo contendo 100 µL de azul de metileno. O microtubo foi agitado em vortex por um 1 min e uma alíquota de 200 µL foi transferida para a placa de Neubauer. A leitura da placa foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. As células coradas em azul foram contadas como mortas e as células incolores como viva. A viabilidade foi determinada pela Equação 2.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{C_v}{C_v + C_m} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: Cv = Células vivas; Cm = Células mortas

### 3.4.3. Plaqueamento

A concentração de levedura e bactéria em UFC.mL<sup>-1</sup> foi determinada no pé-de-cuba (0 horas) e no término de cada ciclo fermentativo (32 horas). Para isso, realizou-se a diluição seriada das amostras (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-12</sup>) seguido pelo plaqueamento de 100 µL da diluição a ser analisada em placas de MRS (Difco, EUA, Detroit) ou YPD. A diluição seriada foi realizada pela a adição 0,1 mL de amostra em 0,9 mL de solução salina (0,9 %) em um microtubo de 2 mL estéril.

Em seguida, realizou-se o plaqueamento de três diluições em duplicata. Para a determinação da concentração de bactéria realizou-se o plaqueamento por profundidade em MRS contendo 50 µg/mL de Ciclohexamida. Para a levedura o plaqueamento foi realizado em superfície em meio YPD 20% (peptona (20 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (10 g.L<sup>-1</sup>), glicose (20 g.L<sup>-1</sup>)) com 200 µg/mL de ampicilina. Ambas as placas foram incubadas a 30 °C por 24-48 horas. Em seguida realizou-se a contagem das diluições com número de colônias entre 30 e 300.

#### 3.4.4. Determinação da concentração de açúcares, ácidos orgânicos e etanol

A determinação da concentração de açúcares, ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico e ácido succinico), glicerol, xilitol e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para realização das análises as amostras foram filtradas em filtro de PVDF Millex 22 µm e diluídas com água destilada. Em seguida realizou-se a injeção das amostras em cromatógrafo (Agilent Infinity 1260) equipado com detector refrativo índice e coluna cromatográfica HPX-87H Aminex (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm). Como condição de análise utilizou-se a temperatura de 35 °C, fase móvel composta por 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído em água ultrapura e vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas pela equipe analítica do CTBE.

#### 3.5. Cálculos dos parâmetros fermentativos

O fator de conversão de açúcares em etanol (Yet/s) foi calculado pela razão entre o etanol produzido (g) e o açúcar consumido (g) (Equação 3):

$$Yet/s = \frac{Etanol\ produzido\ (g)}{Açúcar\ consumido\ (g)} = \frac{Ef - Ei}{A_{fed} - A_r} \quad (3)$$

Onde: Yet/s = Fator de conversão dos açúcares em etanol; E<sub>f</sub> = Massa de etanol final (g); E<sub>i</sub> = Massa de etanol inicial (g); A<sub>fed</sub> = Massa de açúcares fornecidos (g); A<sub>r</sub> = Massa de açúcares residual (g).

O rendimento de etanol (%) foi obtido pela divisão do Yp/s por 0,511 conforme eficiência teórica de Gay-Lussac (0,511 g de etanol por grama de glicose consumida) e multiplicada por 100 para expressar o resultado em porcentagem (Equação 4):

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Yet/s}{0,511} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: Rendimento (%) = Rendimento de etanol; Yet/s = fator de conversão de açúcares em etanol.

O consumo de glicose (%) e consumo de xilose (%) foram calculados pela razão do açúcar consumido (g) pelo açúcar fornecido (g), multiplicado por 100 para expressar os resultados em porcentagem.

O rendimento em relação ao açúcar total disponível (%) foi calculado pela razão de etanol produzido (g) pelo total de açúcares fornecido (g), em seguida o valor obtido foi dividido por 0,511 e multiplicado por 100 (Equação 5).

$$\bar{R} = \frac{\frac{E_f - E_i}{A_f}}{0,511} \cdot 100 \quad (5)$$

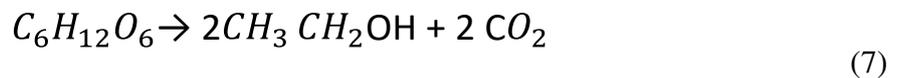
Onde:  $\bar{R}$  (%) = Rendimento em relação ao açúcar total disponível (%);  $E_f$  = Massa de etanol final (g);  $E_i$  = Massa de etanol inicial (g);  $A_f$  = Massa de açúcares fornecidos (g).

O fator de conversão dos açúcares em produto (etanol, CO<sub>2</sub>, biomassa, glicerol, xilitol e ácidos orgânicos) foi calculado pela razão entre a massa de produto produzido (g) pela massa de açúcar consumido (Equação 6).

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Produto produzido (g)}}{\text{Açúcar consumido (g)}} = \frac{P_f - P_i}{A_{fed} - A_r} \quad (6)$$

Onde:  $Y_{p/s}$  = Fator de conversão dos açúcares em produto;  $P_f$  = Massa de produto final (g);  $P_i$  = Massa de produto inicial (g);  $A_{fed}$  = Massa de açúcares fornecidos (g);  $A_r$  = Massa de açúcares residual (g).

A massa de CO<sub>2</sub> produzida (g) foi calculada considerando-se a Equação de Gay-Lussac (Equação 7) em que 1 mol de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) é convertido em 2 mol de etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) e 2 mol de CO<sub>2</sub> (FUGELSANG e EDWARD, 2007).



As curvas de consumo de glicose e xilose foram obtidas pela diferença entre a massa de açúcar fornecido (g) e massa de açúcar residual (g) (Equação 8). A curva de etanol produzido foi construída através da diferença entre a massa de etanol no tempo analisado (g) e a massa de etanol inicial (g) (Equação 9).

$$A_c (g) = ((C_{aa} \cdot M_a) + (C_{ap} \cdot M_p)) - (C_{ad} \cdot M_d) \quad (8)$$

$$E_p (g) = (C_{ed} \cdot M_d) - (C_{ep} \cdot M_p) \quad (9)$$

Onde:  $A_c (g)$  = Açúcar consumido (glicose ou xilose) (g);  $C_{aa}$  = Concentração de açúcar na alimentação ( $g \cdot g^{-1}$ );  $M_a$  = Massa alimentada (g);  $C_{ap}$  = Concentração de açúcar no pé-de-cuba ( $g \cdot g^{-1}$ );  $M_p$  = Massa pé-de-cuba (g);  $C_{ad}$  = Concentração de açúcar na dorna ( $g \cdot g^{-1}$ );  $M_d$  = Massa na dorna (g);  $E_p (g)$  = Etanol produzido (g);  $C_{ed}$  = Concentração de etanol na dorna ( $g \cdot g^{-1}$ );  $C_{ep}$  = Concentração de etanol no pé-de-cuba (g).

As velocidades específicas ( $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) para consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e para formação de produto ( $\mu_p$ ) foram calculadas pelas Equações 10 e 11, respectivamente.

$$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{-ds}{dt} \quad (10)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dp}{dt} \quad (11)$$

Onde:  $\mu_s$  = Velocidade específica de consumo de substrato ( $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) (glicose ou xilose);  $X$  = Massa celular (g);  $-ds/dt$  = consumo de substrato em relação ao tempo;  $\mu_p$  = Velocidade específica de produção de produto ( $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) (etanol);  $dp/dt$  = formação de produto em relação ao tempo.

A razão de glicerol ( $K_G$ ) por etanol, razão de ácidos totais (ácido láctico, ácido acético e ácido succínico) ( $K_{AC}$ ) e a razão de célula ( $K_c$ ) por etanol são dadas pelas Equações 13, 14, 15.

$$K_G = \frac{M_{gf} - M_{gi}}{M_{ef} - M_{ei}} \quad (13)$$

$$K_A = \frac{M_{af} - M_{ai}}{M_{ef} - M_{ei}} \quad (14)$$

$$K_c = \frac{M_{cf} - M_{ci}}{M_{ef} - M_{ei}} \quad (15)$$

Onde:  $K_G$  = Razão de glicerol por etanol (g/g);  $M_{gf}$  = Massa de glicerol final (g);  $M_{gi}$  = Massa de glicerol inicial (g);  $M_{ef}$  = Massa de etanol final (g);  $M_{ei}$  = Massa de etanol inicial (g);  $K_{AC}$  = Razão de ácidos totais por etanol (g/g);  $M_{af}$  = Massa de ácidos totais final (g); Massa de ácidos totais inicial (g);  $M_{ci}$  = Massa de célula inicial;  $M_{cf}$  = Massa de célula final;  $K_c$  = Razão de célula por etanol.

### 3.6. Análise Estatística

Os resultados foram expressos por média  $\pm$  desvio padrão. A determinação da diferença significativa foi realizada pela análise de variância seguida pelo Teste de Tukey com 5 % de nível de probabilidade ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada para comparação entre as médias dos ciclos (ciclo 1 x ciclo 2 x ciclo 3) dentro de uma mesma condição (cultura pura ou co-cultura) (representados por letras). E realizou-se outra análise comparando-se as condições cultura pura e co-cultura dentro do ciclo correspondente (ciclo 1 ou ciclo 2 ou ciclo 3) (representado por asterisco).

### 3.7. Secretoma

#### 3.7.1. Obtenção e preparo da amostra

Para a realização dessa caracterização coletaram-se amostras de 45 mL dos tempos 0, 16 e 32 horas dos ciclos fermentativos 1 e 3 das fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). Em seguida realizou-se a centrifugação da amostra por 10 min a  $3100\times g$ , o *pellet* de célula foi descartado e o sobrenadante foi congelado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  até o preparo da amostra.

O sobrenadante obtido foi concentrado em um concentrador centrífuga 10 kDa MWCO Vivaspin (GE Healthcare) (KAUPERT et al., 2016) (Figura 14) a  $2790\times g$  na temperatura de  $4\text{ }^\circ\text{C}$  até a obtenção de 1 mL de amostra. Após essa etapa a concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bradford 1976), utilizando-se a albumina do soro de leite bovino como padrão. Em um microtubo adicionou-se uma alíquota da amostra com volume suficiente para a obtenção de 10  $\mu\text{g}$  de proteínas totais e adicionou-se água destilada até o volume 220  $\mu\text{L}$ .

Figura 14. Concentrador centrífuga 10 kDa MWCO Vivaspin (GE Healthcare)



### 3.7.2. Digestão das proteínas

A digestão de proteínas foi realizada conforme o protocolo estabelecido pelo LNBIO ([http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2012/11/protocolo\\_digestao\\_soluciao.pdf](http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2012/11/protocolo_digestao_soluciao.pdf)). Para tanto realizou-se a adição de solução aquosa de ureia 8M na proporção 1:1 amostra: solução, seguido pela etapa de redução através da adição de 5 mM de ditioneitol (DTT) e incubação a 56 °C por 25 min. Após esse tempo as proteínas foram alcalinizadas pela adição de 14 mM de Iodoacetamida (IAA) e incubadas por 30 min em temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao término desse processo realizou-se a adição de 5 mM de DTT e novamente as amostras foram incubadas por 15 min na condição da etapa anterior. A concentração de ureia na amostra foi reduzida para 1,6 M através da diluição com bicarbonato de amônio 50 mM e posteriormente adicionou-se 1 mM de solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>). A digestão das proteínas foi finalizada pela adição de 1 µg de tripsina (Promega) para cada 10 µg de proteína e incubação *overnight* na temperatura de 37 °C. A reação da enzima foi interrompida através da adição de 0,4 % ácido trifluoacético, e o pH foi ajustado com esse mesmo ácido até a obtenção de pH inferior a 2.

As amostras foram dessalinizadas através de colunas Sepak (Waters, C18) (Figura 15), secas em concentrador a vácuo (StageTips C18) e congeladas a -20 ° C até a injeção das amostras.

Figura 15. Coluna Sepak (Waters C18) para dessalinização de amostras



### 3.6.3. Análise em cromatografia líquida seguida por espectrometria de massa (LC-MS/MS)

As amostras foram reconstituídas em ácido fórmico 0,1 e a separação dos peptídeos presentes foi realizada por gradiente de hidrofobicidade em coluna C18 (100  $\mu\text{m}$  x 100 mm) em cromatógrafo tipo nano Acquity Ultra Performance LC (Waters) acoplado a uma interface de ESI nanospray em um espectrômetro de massa do tipo Q-ToF Premier (Waters). Para isso utilizou-se fluxo de nanoeletrospray de 0,6  $\mu\text{L. min}^{-1}$ , gradiente de 2%-90% de acetronitrila em 0,1% de ácido fórmico por 60 min. A voltagem utilizada no nanoelectrospray foi equivalente a 3,5 kV com cone de voltagem igual a 30 V e temperatura igual a 100 °C.

### 3.6.4. Análise de dados

Os dados gerados pelo Q-ToF foram processados através do programa Mascot Distiller v.2.3.2.0 (Matrix Science Ltd). Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot Server v.2.3.01.0 (Matrix Science Ltda.), tendo como parâmetros uma clivagem perdida pela tripsina, modificação fixa de carbamidometilação, modificação variável de oxidação da metionina, 0,1 Da de tolerância de massas para MS e 0,1 Da de tolerância de massas para MS/MS. As buscas foram realizadas utilizando o banco de dados para *S. passalidarum* contendo 174 sequências e 75819 resíduos e para *L. fermentum* contendo 27134 sequências e 8268054 resíduos.

## CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização do crescimento e consumo de açúcares por *L. fermentum* I2 em diferentes meios fermentativos.

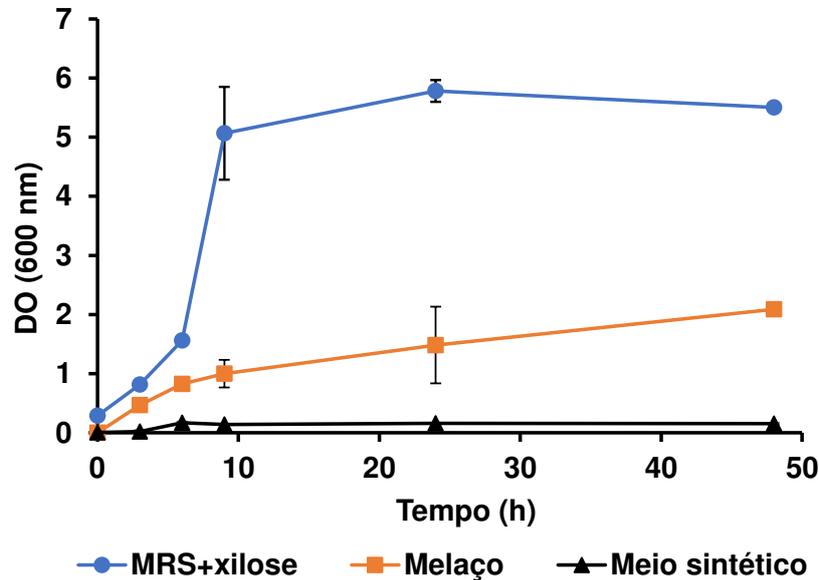
O crescimento (Figura 16) e o consumo de açúcares (Figura 17) por *L. fermentum* I2 foram avaliados em três meios distintos: MRS + xilose (glicose e xilose), melão (glicose, frutose e sacarose) e meio sintético (glicose e xilose). O MRS suplementado com xilose foi utilizado nesse trabalho, já que é um meio rico e possui os nutrientes essenciais para BALs. O melão, matéria-prima para produção de etanol 1G, foi utilizado pois Basso et al (2014) verificaram que *L. fermentum* FT-230 B é capaz de crescer e consumir açúcares nesse substrato na ausência da levedura. O meio sintético foi avaliado, uma vez que foi o meio utilizado nos experimentos de fermentação em batelada alimentada com reuso celular em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

Na Figura 16, é possível verificar que *L. fermentum* I2 é capaz de crescer em MRS + xilose e melão, entretanto não foi capaz de crescer em meio sintético. Diferentemente do MRS + xilose e melão, o meio sintético é menos complexo e pobre em nutrientes como aminoácidos e vitaminas.

Em hidrolisado lignocelulósico de madeira obtido por tratamento ácido, Albers et al. (2011) também verificaram a incapacidade de 15 linhagens de *Lactobacillus* de crescer e manter a viabilidade nesse meio na ausência da levedura. Os autores acreditam que essa característica se deve a detoxificação do meio pela levedura e pelo fornecimento de nutrientes da levedura para a bactéria. Nesse trabalho, os autores verificaram que a suplementação com extrato de levedura não possui o mesmo efeito que a presença da levedura viva, desta forma as bactérias isoladas não foram capazes de se devolver e manter a viabilidade em hidrolisado suplementado.

BALs possuem intensa competição com a levedura, contudo, acredita-se que exista uma dependência dessas bactérias por nutrientes fornecido pela levedura (BREXÓ e SANT' ANA, 2017). BALs possuem complexo fator de crescimento e requerem vitaminas do complexo B, diversos aminoácidos e purinas e pirimidinas (FITZPATRICK e O' KEEFFE, 2001).

Figura 16. Perfil do crescimento de *L. fermentum* I2 em relação ao tempo obtido por densidade óptica (600 nm) nos meios MRS + xilose, melação e meio sintético.



Na Figura 17, apresenta-se o consumo de açúcares e produção de ácidos orgânicos e etanol por *L. fermentum* I2 em MRS + xilose, melação e meio sintético.

Em MRS + xilose foi possível verificar que *L. fermentum* I2 possui a capacidade de consumir glicose e xilose (Figura 17 a). Em meio composto por  $10,88 \pm 0,29$  g.L<sup>-1</sup> de glicose e  $7,89 \pm 0,33$  g.L<sup>-1</sup> de xilose não se verifica a repressão do consumo de xilose pela presença da glicose, sendo os açúcares consumidos simultaneamente. O produto majoritário obtido nessa condição foi o ácido láctico ( $15,90 \pm 0,69$  g.L<sup>-1</sup>), seguido por etanol ( $2,83 \pm 0,04$  g.L<sup>-1</sup>) e ácido acético ( $2,88 \pm 0,0007$  g.L<sup>-1</sup>).

O resultado obtido foi condizente com o descrito por Zhang et al (2016), que demonstraram a capacidade do *L. fermentum* 1001 de fermentar simultaneamente glicose e xilose em hidrolisado de bagaço de milho detoxificado e suplementado. Para meio contendo  $2,49$  g.L<sup>-1</sup> de glicose e  $9,68$  g.L<sup>-1</sup> de xilose obteve-se  $6,69$  g.L<sup>-1</sup> de lactato e  $5,22$  g.L<sup>-1</sup> de acetato. Para meio composto por  $9,41$  g.L<sup>-1</sup> de glicose e  $3,53$  g.L<sup>-1</sup> de xilose obteve-se a produção de  $5,85$  g.L<sup>-1</sup> de lactato,  $1,84$  g.L<sup>-1</sup> de etanol e  $2,1$  g.L<sup>-1</sup> de acetato. Moura et al. (2007) também verificaram a capacidade de *L. fermentum* ATCC 9338 de crescer em glicose e xilose com velocidade específica de crescimento de  $0,09$  e  $0,32$  h<sup>-1</sup>, respectivamente.

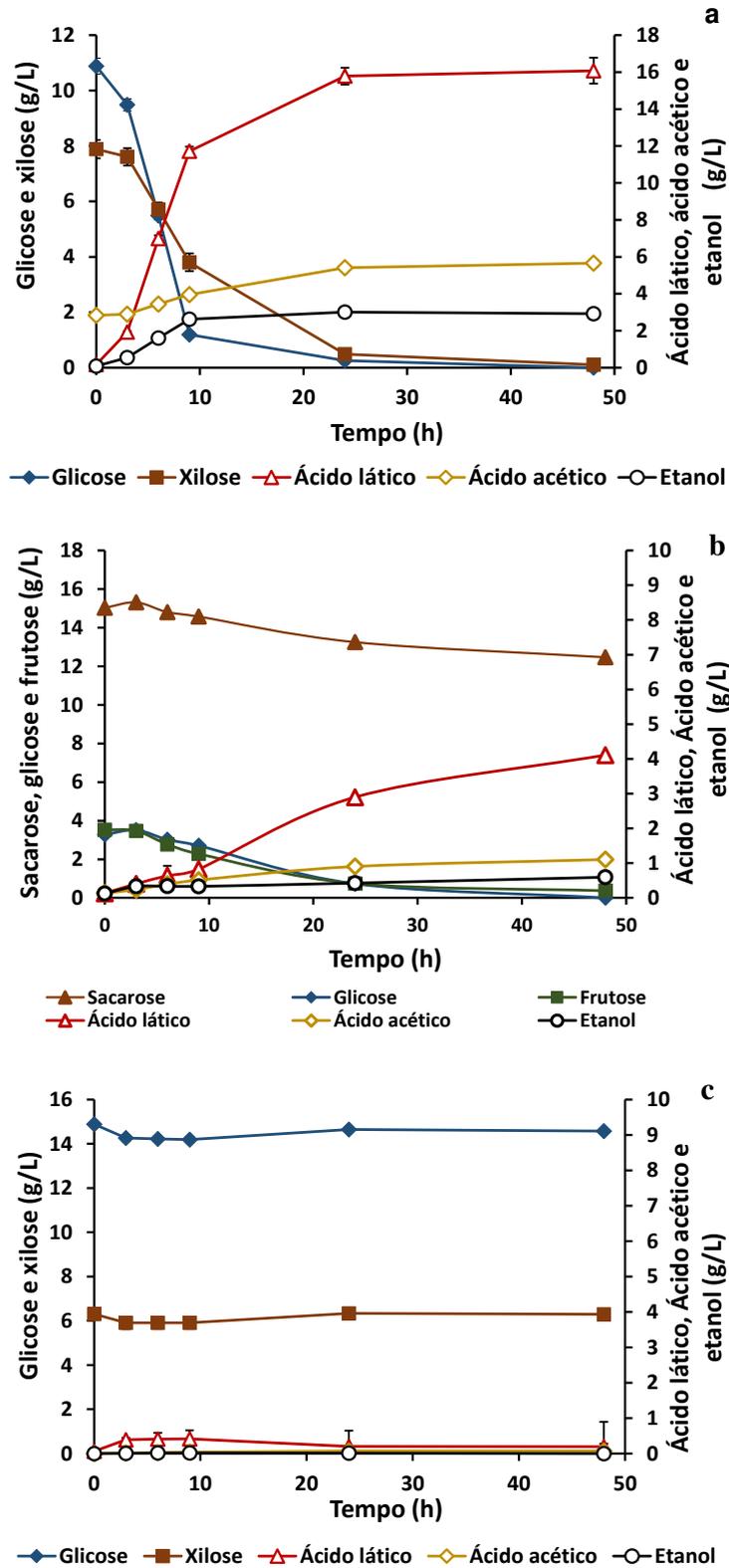
Em melação (Figura 17 b), *L. fermentum* I2 consumiu toda glicose e frutose ( $3,53 \pm 0,07$  g.L<sup>-1</sup> e  $3,28 \pm 0,05$  g.L<sup>-1</sup>, respectivamente), consumiu  $2,56 \pm 0,23$  g.L<sup>-1</sup> de sacarose (de um total

de  $15,83 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}$ ) e produziu  $3,98 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico,  $0,97 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido acético e  $0,47 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol.

Nesse trabalho, não se verificou a preferência por glicose ou frutose, ambos os açúcares foram consumidos simultaneamente. Basso et al (2014) verificaram que em meio composto por mesma concentração de glicose e frutose, BALs heterofermentativas como *L. fermentum* FT-230 B possuem consumo preferencial de frutose do que glicose. A conversão de acetil fosfato em acetato ao invés de etanol produz um ATP adicional, desta forma, um excedente de  $\text{NAD}^+$  pode ser alcançado, o que resulta em receptor de elétrons alternativo. Sobre condições de aerobiose, o oxigênio pode servir como um receptor de elétrons, porém sobre condições de anaerobiose e sob condição de limitação de oxigênio, frutose pode ser reduzida a manitol. Desta forma, frutose pode funcionar como um importante co-substrato para *Lactobacillus* heterofermentativas (BASSO et al., 2014).

Em meio sintético com glicose e xilose como fonte de carbono (Figura 17 c), *L. fermentum* não foi capaz de assimilar xilose e consumiu  $0,31 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose com produção de  $0,13 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido láctico e  $0,07 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido acético.

Figura 17. Consumo de açúcares e produção de produtos (ácido lático, ácido acético e etanol) pelo *L. fermentum* I2. a) MRS + xilose; b) melaço; c) Meio sintético (glicose e xilose).



## 5.2. Determinação do efeito da contaminação bacteriana por *L. fermentum* I2 no processo fermentativo por *S. passalidarum* em meio sintético.

O efeito da contaminação bacteriana por *L. fermentum* no processo fermentativo de *S. passalidarum* foi avaliado em fermentações em batelada alimentada com reuso celular em duas condições distintas: cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

Os experimentos foram realizados em meio sintético com proporção 70:30 glicose: xilose levando em consideração a maior concentração de glicose do que xilose em hidrolisados lignocelulósicos obtidos por pré-tratamento alcalino. Nas Figuras 18 e 19, apresenta-se a concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de glicose, xilose, etanol e massa de célula seca (MCS) por tempo (h) para fermentações em cultura pura e co-cultura, respectivamente.

Nas Figuras 18 e 19, é possível observar que a glicose foi totalmente consumida no tempo de 24-28 h para fermentações em cultura pura e 28-32 h para fermentações em co-cultura. Em ambas as condições, a xilose não foi totalmente consumida após 32 h e a massa de célula seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no pé-de-cuba ( $t = 0$  h) sofreu decréscimo ao longo dos ciclos fermentativos. Para as fermentações com cultura pura de *S. passalidarum* a massa de célula seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo inicial de fermentação variou de  $55,72 \pm 2,87$  no ciclo 1 para  $45,03 \pm 4,73$  no ciclo 3 e para as fermentações com *S. passalidarum* e *L. fermentum* variou de  $55,72 \pm 2,87$  no ciclo 1 para  $48,39 \pm 4,17$  no ciclo 3. *S. passalidarum* apresentou baixo crescimento ao longo dos ciclos fermentativos, o que foi insuficiente para repor as células perdidas durante o reciclo celular. Essa levedura caracteriza-se por ser *Crabtree* negativa, desta forma para a manutenção do crescimento e renovação celular é necessário que haja aeração do sistema (NAKANISHI et al., 2017).

Nakanishi et al (2017) realizaram a otimização da produção de etanol através de hidrolisado lignocelulósico alcalino de bagaço de cana com *S. passalidarum*. Para tanto, os autores utilizaram alta concentração celular, reciclo celular, decréscimo de temperatura e suplementação do meio de cultura com extrato de leveduras ( $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ). Como resultado, os autores obtiveram redução no tempo de consumo dos açúcares e melhora nos parâmetros fermentativo ao longo dos reciclos celulares.

Figura 18. Perfil de concentração de glicose, xilose, etanol e massa de célula seca (MCS) ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em relação ao tempo (h) em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■), etanol (▲) e MSC (▼).

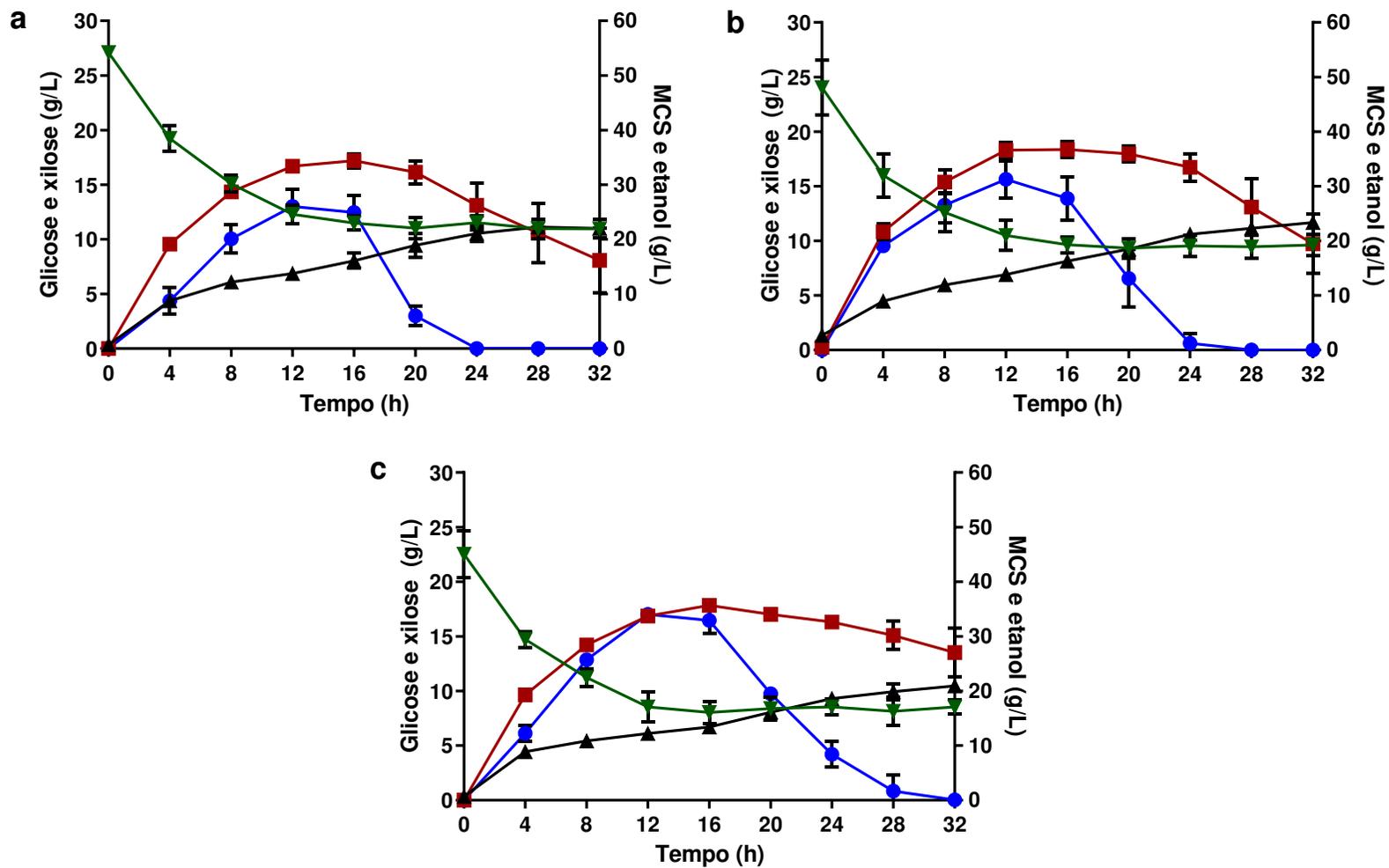
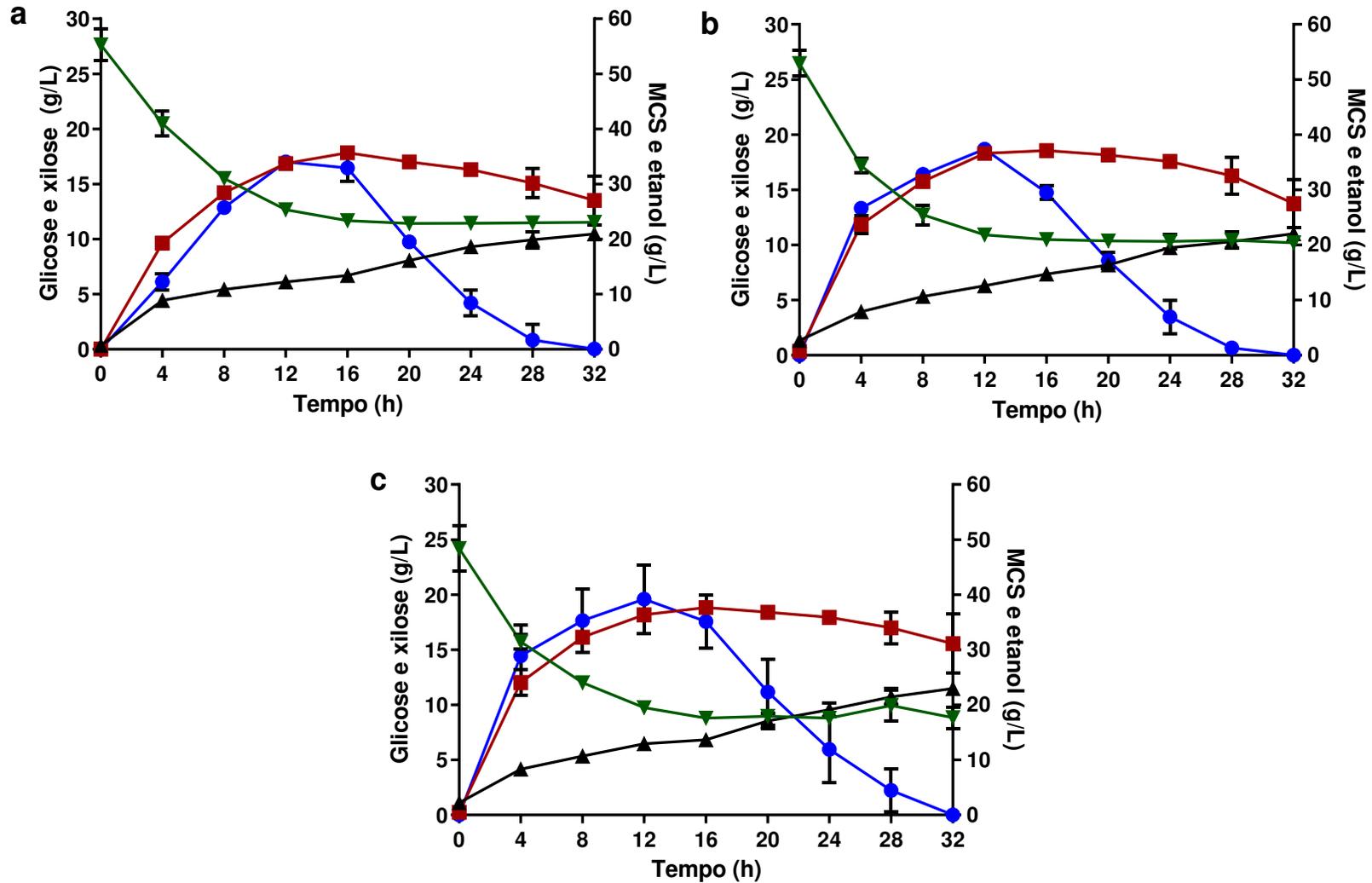


Figura 19. Perfil de concentração de glicose, xilose, etanol e massa de célula seca (MCS) ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em relação ao tempo (h) em fermentações em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■), etanol (▲) e MCS (▼).



Na Tabela 5, apresentam-se o consumo de glicose e xilose (g) e a produção de etanol (g) em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

Tabela 5. Consumo de glicose xilose e produção de etanol após 32 h de fermentação em cultura pura (*S. passalidarum*) e co- cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

<i>S. passalidarum</i>			
Ciclo	Glicose (g)	Xilose (g)	Etanol (g)
1	66,84 ± 1,08 <sup>a*</sup>	14,93 ± 1,48 <sup>a</sup>	28,70 ± 0,08 <sup>a*</sup>
2	66,12 ± 0,73 <sup>ab**</sup>	12,81 ± 0,15 <sup>ab</sup>	30,51 ± 1,69 <sup>b**</sup>
3	65,56 ± 1,63 <sup>b***</sup>	6,57 ± 2,68 <sup>b*</sup>	29,87 ± 2,64 <sup>ab***</sup>
<i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i>			
Ciclo	Glicose (g)	Xilose (g)	Etanol (g)
1	67,21 ± 1,12 <sup>a*</sup>	12,10 ± 0,39 <sup>a</sup>	26,66 ± 1,62 <sup>a*</sup>
2	66,95 ± 1,54 <sup>ab**</sup>	7,05 ± 0,28 <sup>ab</sup>	28,99 ± 0,60 <sup>a**</sup>
3	65,14 ± 3,90 <sup>b***</sup>	4,41 ± 1,81 <sup>b*</sup>	29,18 ± 0,54 <sup>a***</sup>

<sup>a, b</sup> Teste estatístico realizado entre os ciclos (ciclo 1 x ciclo 2 x ciclo 3) da mesma condição (cultura pura ou co-cultura). \*, \*\*, \*\*\*, Teste estatístico realizado entre as condições (cultura pura x co-cultura) em um mesmo ciclo (ciclo 1 ou ciclo2 ou ciclo 3). Médias com o mesmo símbolo ou letra em cada coluna não são estatisticamente diferentes (p < 0,05) de acordo com o teste de Tukey. (Médias analisadas em triplicata, com exceção do consumo de xilose que foi analisada em duplicata).

Na Tabela 5, verifica-se que não houve diferença de consumo de glicose (g) entre as duas condições (p < 0,05) e ao longo dos ciclos fermentativos o consumo desse açúcar diminui para ambas as condições testadas. Em relação ao consumo de xilose, observa-se que existe diferença significativa (p < 0,05) entre as fermentações em cultura pura e co-cultura e ao longo dos ciclos fermentativos o consumo desse açúcar diminui. Não houve diferença significativa (p < 0,05) na produção de etanol entre as duas condições.

Nas Figuras 20 e 21, apresentam-se o consumo de glicose e xilose (g) e a produção de etanol (g) em relação ao tempo (h). Por meio dessas figuras calcularam-se os parâmetros fermentativos das fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*), apresentados na Tabela 6.

Figura 20. Consumo de glicose e xilose e produção de etanol (g) em relação ao tempo (h) em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲).

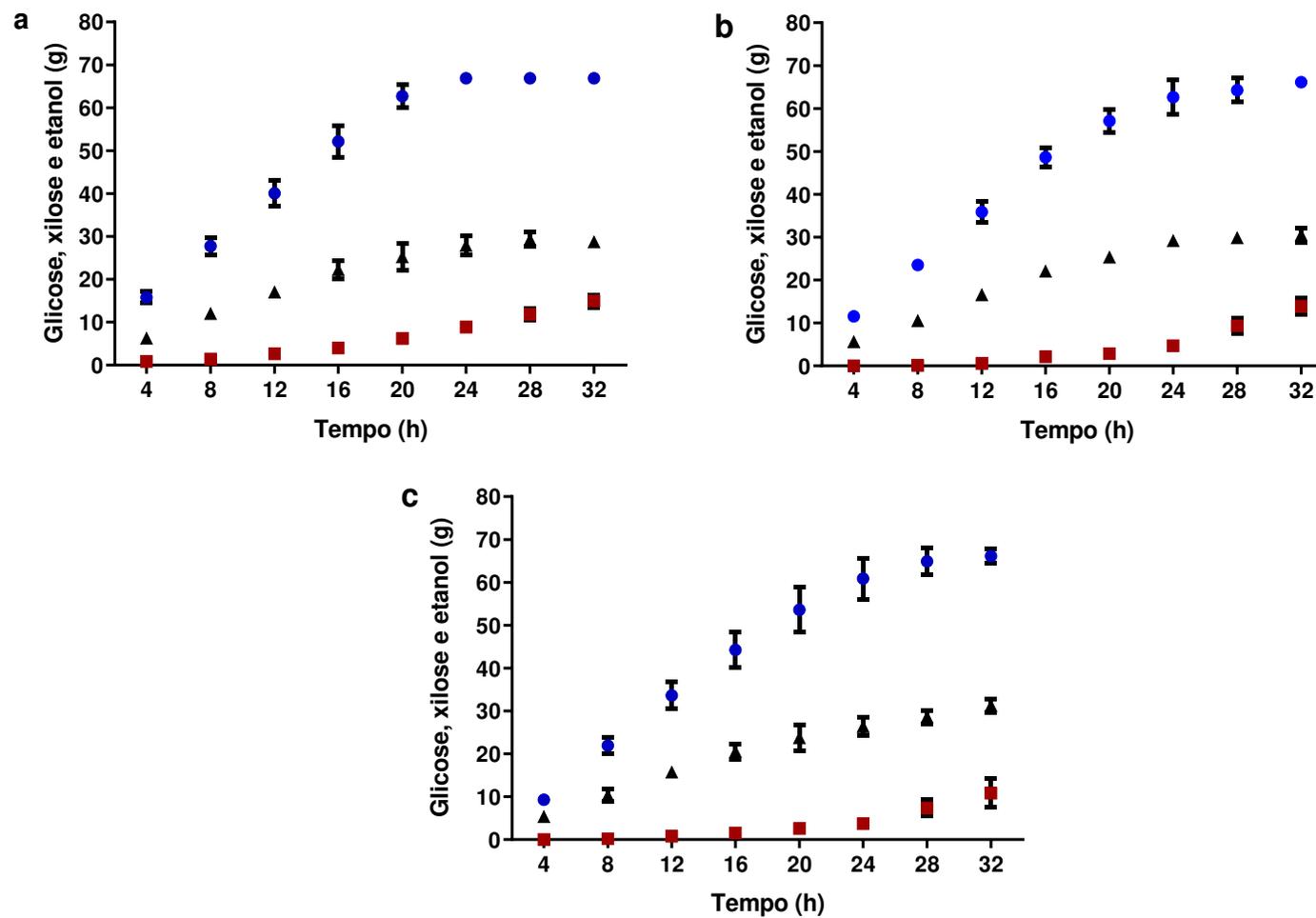


Figura 21. Consumo de glicose e xilose e produção de etanol (g) em relação ao tempo (h) em fermentações em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). a) ciclo 1, b) ciclo 2 e c) ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲).

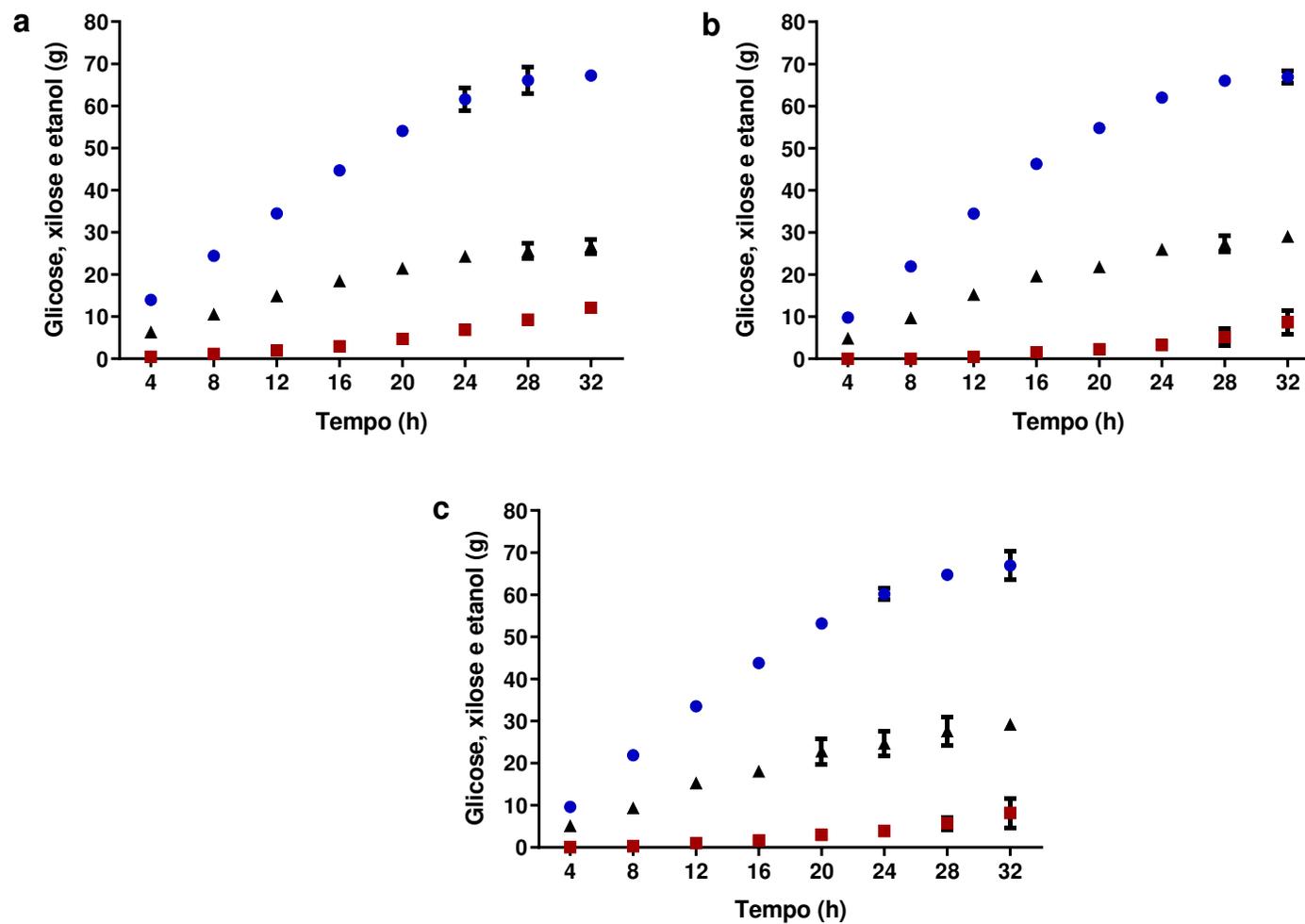


Tabela 6. Parâmetros cinéticos de fermentações com *S. passalidarum* e *S. passalidarum* + *L. fermentum* a 30 °C com dois ciclos celulares após 32 h. Fator de conversão de substrato em etanol ( $Y_{et/s}$ ) ( $g \cdot g^{-1}$ ), Rendimento em relação ao açúcar total consumido (Rendimento) (%), Consumo de glicose (%), Consumo de xilose (%), Produtividade volumétrica de etanol (Qp) ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ), Título de etanol ( $g \cdot L^{-1}$ ) e Rendimento em relação ao açúcar total disponível  $\overline{R}$  (%).

<i>S. passalidarum</i>							
Ciclo	$Y_{et/s}$	Rendimento (%)	Consumo de glicose (%)	Consumo de xilose (%)	Qp ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	Título de etanol ( $g \cdot L^{-1}$ )	$\overline{R}$ (%)
1	$0,34 \pm 0,01^{a*}$	$67,05 \pm 2,12^{a*}$	$100,0 \pm 0,00^{a*}$	$53,96 \pm 5,88^{a*}$	$0,68 \pm 0,01^{a*}$	$21,72 \pm 0,41^{a*}$	$30,40 \pm 0,39^{a*}$
2	$0,38 \pm 0,01^{b,c**}$	$72,54 \pm 3,02^{b,c**}$	$99,70 \pm 0,52^{a**}$	$44,86 \pm 0,54^{a,b}$	$0,70 \pm 0,03^{a**}$	$22,40 \pm 0,84^{a**}$	$32,34 \pm 2,41^{b**}$
3	$0,40 \pm 0,01^{c***}$	$78,55 \pm 2,33^{c***}$	$97,21 \pm 4,83^{a***}$	$22,99 \pm 8,19^{b**}$	$0,66 \pm 0,05^{a***}$	$21,23 \pm 1,55^{a***}$	$31,36 \pm 3,67^{a,b***}$
<i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i>							
Ciclo	$Y_{et/s}$	Rendimento (%)	Consumo de glicose (%)	Consumo de xilose (%)	Qp ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	Título de etanol ( $g \cdot L^{-1}$ )	$\overline{R}$ (%)
1	$0,34 \pm 0,03^{a*}$	$67,75 \pm 5,27^{a*}$	$99,95 \pm 0,08^{a*}$	$44,00 \pm 2,78^{a*}$	$0,65 \pm 0,03^{a*}$	$20,67 \pm 0,85^{a*}$	$28,21 \pm 1,50^{a*}$
2	$0,38 \pm 0,01^{a**}$	$75,06 \pm 2,72^{a**}$	$100,0 \pm 0,00^{a**}$	$25,85 \pm 0,87^b$	$0,66 \pm 0,02^{a**}$	$21,08 \pm 0,78^{a**}$	$30,64 \pm 0,49^{a,b**}$
3	$0,40 \pm 0,03^{a***}$	$79,83 \pm 6,88^{a***}$	$100,0 \pm 0,00^{a***}$	$16,58 \pm 5,99^{c**}$	$0,69 \pm 0,01^{a***}$	$22,11 \pm 0,22^{a***}$	$31,77 \pm 2,00^{b***}$

<sup>a, b, c</sup> Teste estatístico realizado entre os ciclos (ciclo 1 x ciclo 2 x ciclo 3) da mesma condição (cultura pura ou co-cultura). <sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup>, Teste estatístico realizado entre as condições (cultura pura x co-cultura) em um mesmo ciclo (ciclo 1 ou ciclo 2 ou ciclo 3). Médias com o mesmo símbolo ou letra em cada coluna não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. (Médias analisadas em triplicata, com exceção do consumo de xilose que foi analisada em duplicata).

Por meio dos dados apresentados na Tabela 6 é possível verificar que *L. fermentum* teve baixo impacto nos parâmetros fermentativos de *S. passalidarum*. Os parâmetros calculados não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as fermentações em cultura pura e co-cultura, com exceção do consumo de xilose. Nas fermentações em cultura pura verificou-se aumento no valor de  $Y_{et/s}$  e do rendimento do ciclo 3 em relação ao ciclo 1 ( $p < 0,05$ ). Em ambas as condições, o consumo de xilose diminuiu ( $p < 0,05$ ) ao longo dos ciclos fermentativos.

Os valores de  $Y_{et/s}$  obtidos nesse trabalho variaram de 0,34 a 0,40, com rendimento de etanol de 67% a 79 %. Na literatura para *S. passalidarum* encontram-se valores de  $Y_{et/s}$  variando de 0,16 (VERAS et al. 2017) a 0,48 (HOU, 2012; CADETE et al., 2016). Uma variedade de fatores influencia na conversão de xilose em etanol, um exemplo é a presença de inibidores como o ácido acético em concentrações maiores que 2-5 g.L<sup>-1</sup> (NAKANISHI et al., 2017). No trabalho desenvolvido por Morales et al (2017), os autores obtiveram um valor de  $Y_{et/s}$  igual a 0,22, sendo que esse baixo valor deve-se a alta concentração de inibidores presente no hidrolisado (g.L<sup>-1</sup>): ácido acético (4,7), furfural (1), HMF (0,35) e ácido fórmico (0,57). Desta forma, nesse trabalho optou-se pela realização dos experimentos baseando-se no licor alcalino obtido por pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática conforme Nakanishi et al (2017), que possui como característica a ausência de inibidores. Os valores de  $Y_{et/s}$  obtidos nesse trabalho corroboram com o valor de 0,32 obtido por Nakanishi et al. (2017) na temperatura de 30 °C, entretanto, o meio sintético é menos complexo do que o real e nesse trabalho não se realizou a suplementação do meio com extrato de levedura.

Tanto nas fermentações em cultura pura como em co-cultura, o título de etanol obtido foi aproximadamente 21 g.L<sup>-1</sup>, independentemente do ciclo analisado e a produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) variou de 0,65 a 0,70 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Os valores de  $Q_p$  na literatura variam de 0,09 (MORALES et al., 2017) a 1,14 (LONG et al., 2012), sendo que valores mais altos de  $Q_p$  podem ser obtidos através do controle de oxigênio (SU, WILLIS e JEFRIES, 2015). O objetivo desse projeto de pesquisa foi avaliar o efeito de *L. fermentum* I2 no processo fermentativo de *S. passalidarum* e não a otimização de processo, a utilização de um maior tempo de fermentação poderia resultar no completo consumo dos açúcares e maior produção de etanol. Na literatura existem diversos estudos de otimização como Su et al (2015), Nakanishi et al (2017) e Morales et al (2017).

A presença do *L. fermentum* I2 não afetou os parâmetros fermentativo de *S. passalidarum* em meio composto por glicose e xilose. A literatura disponível sobre o estudo do efeito de contaminantes no processo fermentativo de leveduras naturalmente fermentadoras de

xilose é escassa, entretanto, existem muitos estudos que descrevem efeito da contaminação bacteriana no processo fermentativo de primeira geração com *S. cerevisiae*.

Carvalho-Netto et al. (2015) demonstraram que o *L. fermentum* é a principal espécie de bactéria associada com a floculação celular em dornas de fermentação das usinas sucroalcooleiras brasileiras. Os autores estudaram fermentações com e sem floculação utilizando a levedura PE-2. As fermentações com floculação apresentaram: baixo título de etanol, baixa produção de glicerol, altas concentrações de ácido lático e ácido acético e baixa hidrólise de sacarose.

No trabalho desenvolvido por Basso et al (2014), a presença do *L. fermentum* FT 230-B não afetou a viabilidade da levedura CAT-1, contudo, causou decréscimo na produção de etanol, devido a competição de nutrientes entre levedura e bactéria. Nesse trabalho, nem a viabilidade da levedura e nem os parâmetros fermentativos foram afetados pela presença da bactéria. Esse resultado é consistente com o obtido por Costa et al (2018), que estudaram a adição de etanol no tratamento ácido para o controle da contaminação por *L. fermentum*. Nesse trabalho os autores verificaram que nas fermentações onde utilizou-se o tratamento ácido a presença da bactéria não teve efeito sobre os parâmetros fermentativos.

Nas figuras 22 e 23, apresentam-se os fatores de conversão de substrato nos produtos ( $Y_{p/s}$ ): etanol, CO<sub>2</sub>, célula, xilitol, glicerol, ácido lático, ácido acético e ácido succínico. Esses fatores foram calculados através da divisão da massa de produto (g) por massa de substrato (g). A soma dos valores de  $Y_{p/s}$  deve ser igual a 1. Através das figuras, é possível verificar que os produtos majoritários da fermentação foram etanol, CO<sub>2</sub>, célula e xilitol.

Nesse trabalho verifica-se alta formação de xilitol, para o qual, considerando-se apenas a xilose consumida, tem-se como fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{\text{xilitol/xilose}}$ ) ( $\text{g.g}^{-1}$ )  $0,41 \pm 0,07$ ;  $0,42 \pm 0,07$  e  $0,39 \pm 0,02$  para os ciclos 1, 2 e 3, respectivamente, para fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e  $0,36 \pm 0,04$ ;  $0,54 \pm 0,02$  e  $0,44 \pm 0,04$  para os ciclos 1, 2 e 3 para as fermentações em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

Na conversão de xilose em etanol são requeridas as enzimas XR e XDH. A enzima XR realiza a conversão de xilose em xilitol utilizando o cofator NADPH ou NADH (preferencialmente NADH para *S. passalidarum*) e a enzima XDH realiza a conversão do xilitol em etanol utilizando o cofator NAD<sup>+</sup>. Em concentrações insuficientes de NAD<sup>+</sup> ocorre acúmulo de xilitol e bloqueio do metabolismo de xilose. Um modo de aumentar a produção de etanol e evitar acúmulo de xilitol é o fornecimento controlado de oxigênio, que regenera NAD<sup>+</sup> (HOU, 2012; KWAK e JIN, 2017).

Figura 22. Fatores de conversão de substrato (glicose e xilose) em produtos (etanol, CO<sub>2</sub>, xilitol, célula, ácido acético, ácido lático, ácido succínico, glicerol e outros produtos) em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*). (a) Ciclo 1, (b) Ciclo 2 e (c) Ciclo 3.

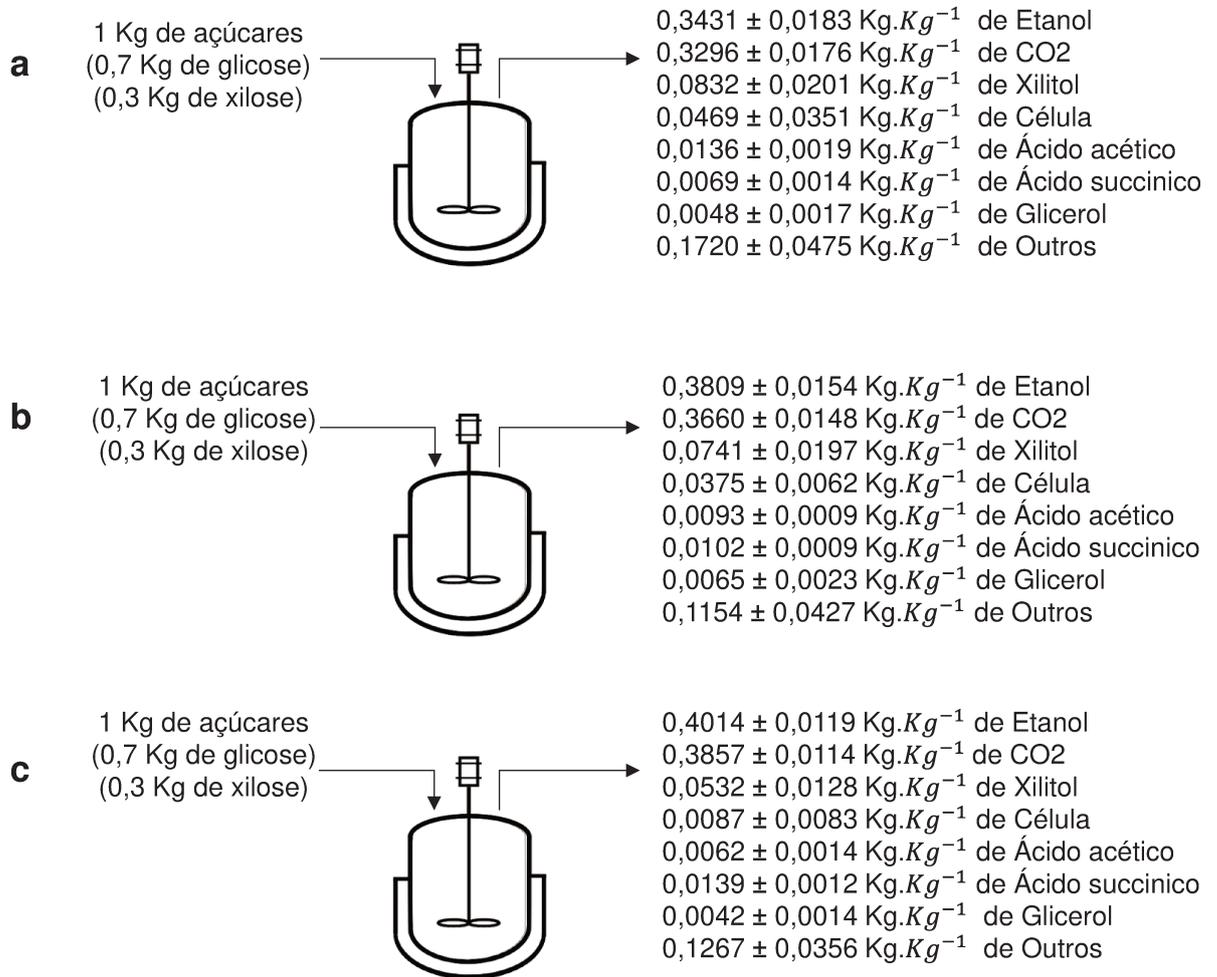
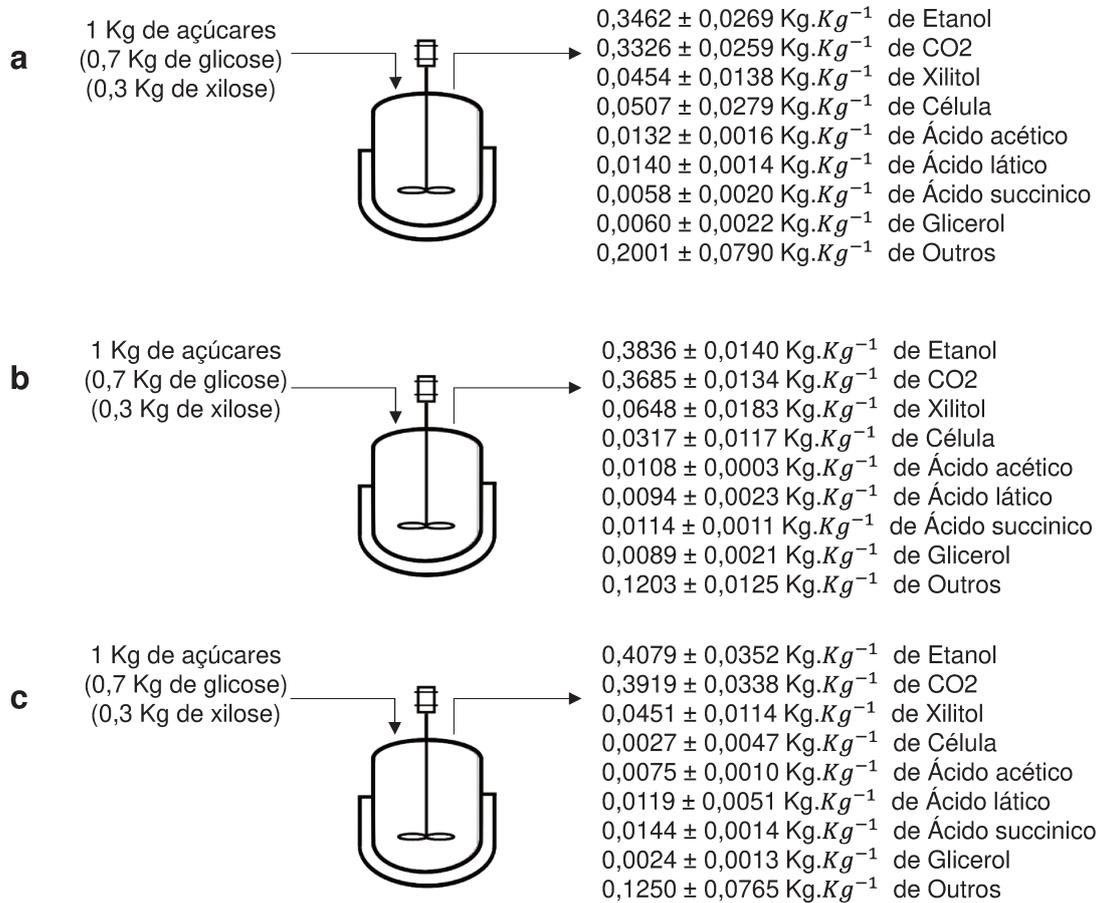


Figura 23. Fatores de conversão de substrato (glicose e xilose) em produtos (etanol, CO<sub>2</sub>, xilitol, célula, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, glicerol e outros produtos) em fermentações em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). (a) Ciclo 1, (b) Ciclo 2 e (c) Ciclo 3.



Partindo-se das curvas apresentadas nas figuras 20 e 21, calcularam-se as velocidades específicas (g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de consumo de glicose e xilose e produção de etanol em relação ao tempo (Figura 24 e 25).

Nas Figuras 24 e 25, é possível verificar que em ambas as condições a velocidade específica de produção de etanol é diretamente proporcional a velocidade específica de consumo de glicose e o início do consumo da xilose não é dependente do esgotamento da glicose. Esta condição já era esperada, uma vez que o açúcar que rege a cinética do sistema é o majoritário e para o caso de hidrolisados de pré-tratamento alcalino é a glicose. Entretanto a velocidade específica de consumo de xilose (g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) aumenta na medida em que a velocidade específica de consumo de glicose (g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) diminui, marcando a repressão catabólica no sistema. Além disso, observa-se maior velocidade de consumo de açúcares (xilose e glicose) na fermentação em cultura pura do que em co-cultura.

Figura 24. Velocidade específica ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de consumo de glicose e xilose e produção de etanol em fermentações em pura cultura (*S. passalidarum*) em relação ao tempo (h). a) Ciclo 1; b) Ciclo 2; c) Ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲).

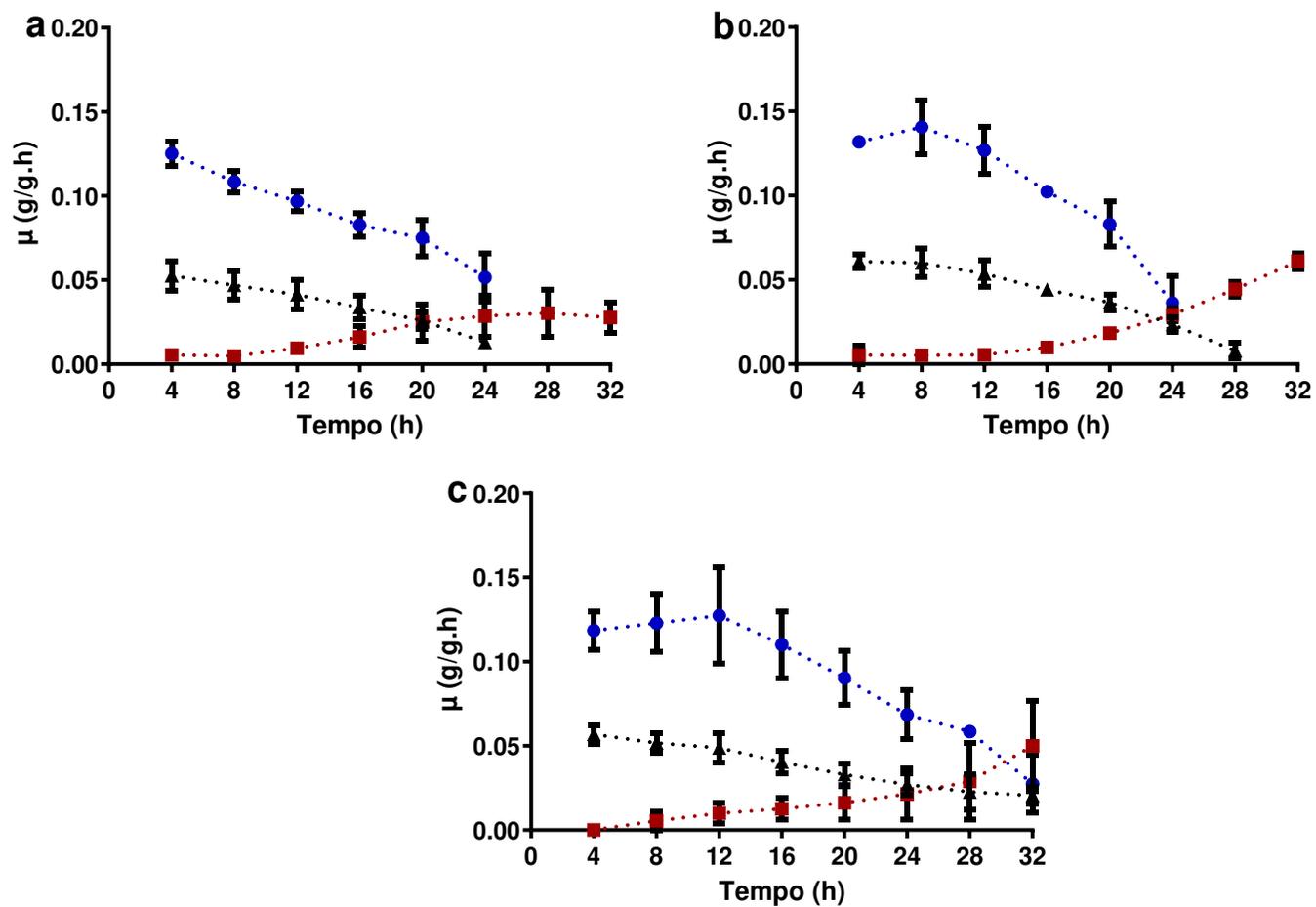
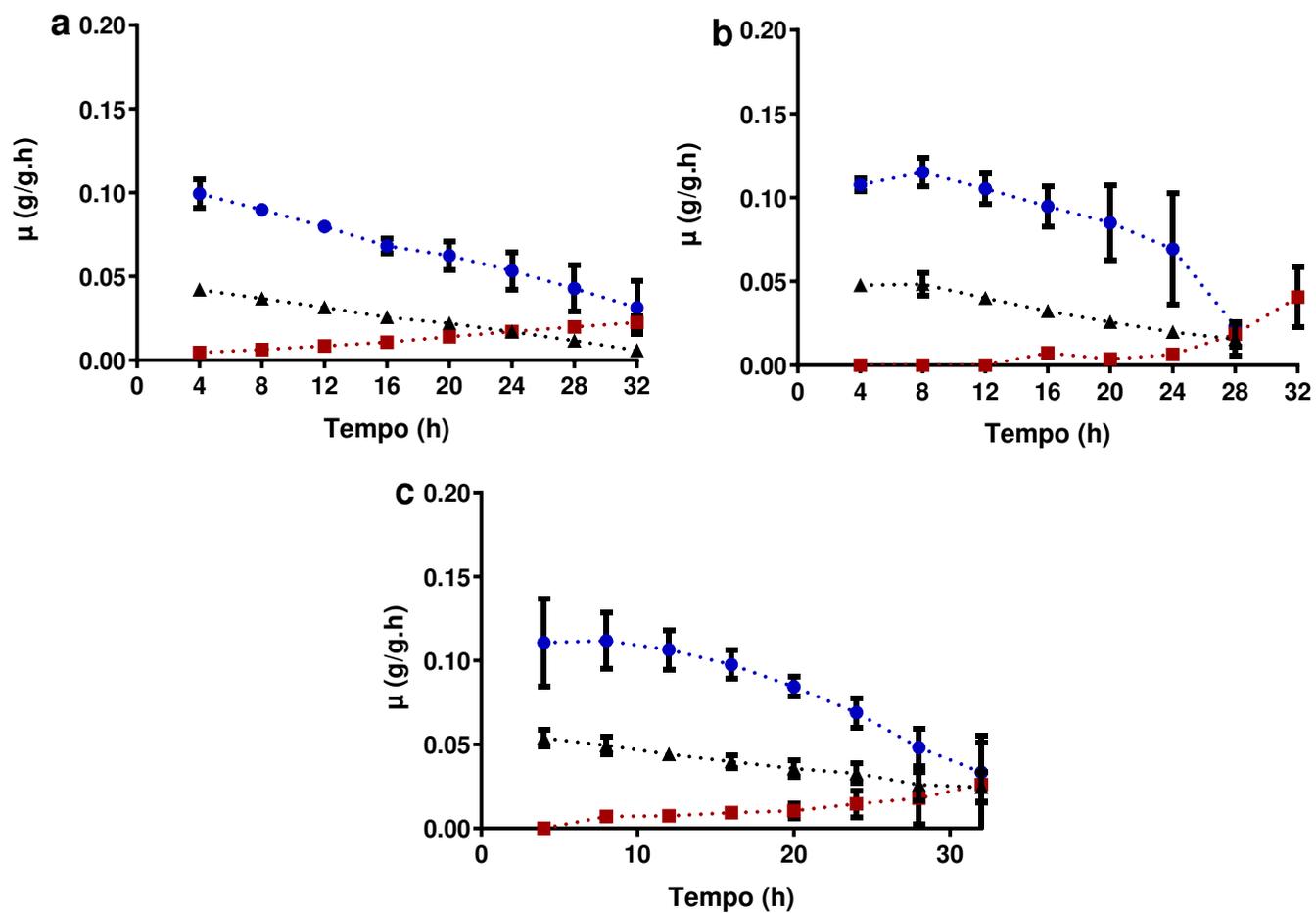


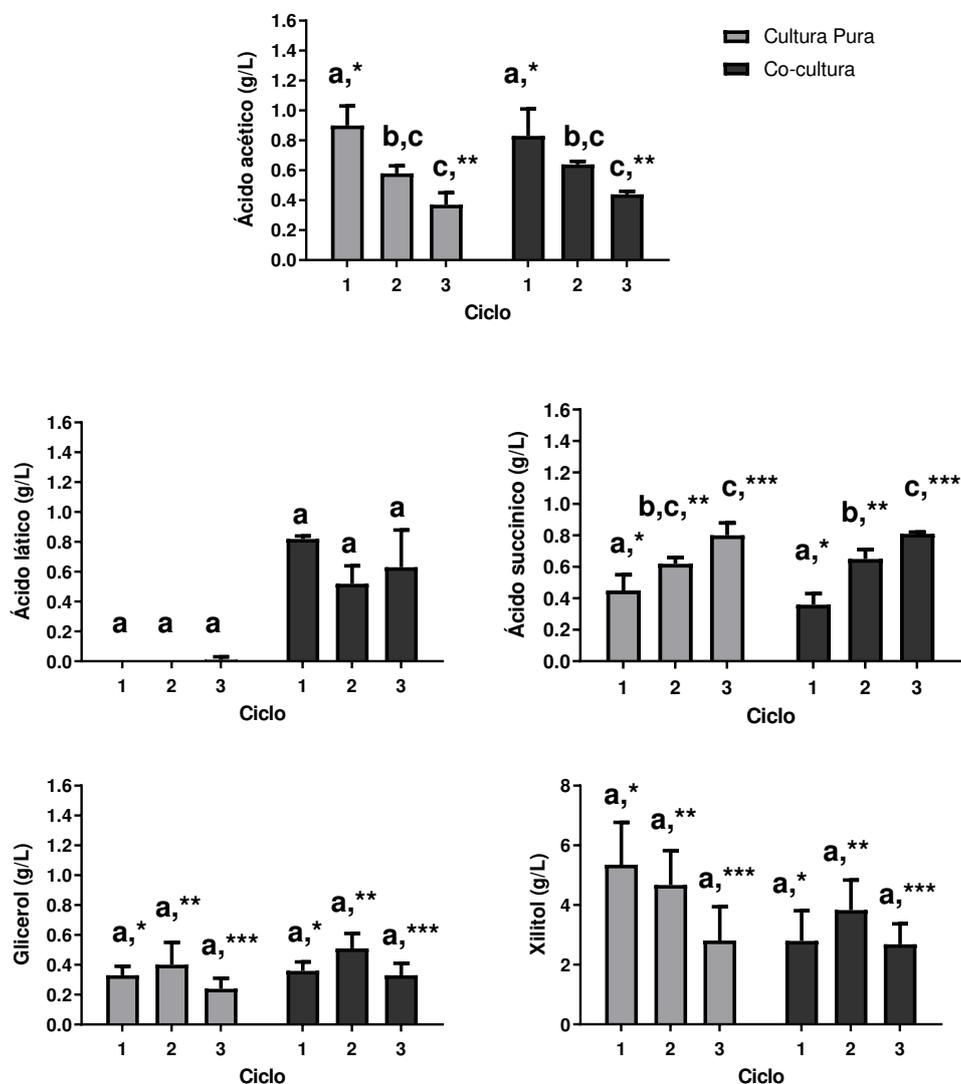
Figura 25. Velocidade específica ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de consumo de glicose e xilose e produção de etanol em fermentações em pura cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentm*) em relação ao tempo (h). a) Ciclo 1; b) Ciclo 2; c) Ciclo 3. Glicose (●), xilose (■) e etanol (▲).



### 5.3. Subprodutos em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

As concentrações de ácido lático, ácido acético, ácido succínico, glicerol e xilitol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo de 32 h em três ciclos fermentativos em cultura-pura e co-cultura são apresentados na Figura 26.

Figura 26. Concentração de ácido acético, ácido lático, ácido succínico, glicerol e xilitol ( $\text{g.L}^{-1}$ ) após 32 h em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).



a, b, c Teste estatístico realizado entre os ciclos (ciclo 1 x ciclo 2 x ciclo 3) da mesma condição (cultura pura ou co-cultura). \*, \*\*, \*\*\*, Teste estatístico realizado entre as condições (cultura pura x co-cultura) em um mesmo ciclo (ciclo 1 ou ciclo2 ou ciclo 3). Médias com o mesmo símbolo ou letra em cada coluna não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. (Médias analisadas em triplicata, com exceção da produção de xilitol que foi analisada em duplicata).

Por meio da Figura 26, é possível verificar que ácido láctico foi produzido apenas nas fermentações em co-cultura de *S. passalidarum* com *L. fermentum*, com concentração máxima de  $0,83 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}$  no ciclo 1. Para  $p < 0,05$  pelo teste de Tukey não houve diferença significativa na concentração de ácido acético, ácido succínico e glicerol entre as fermentações em cultura pura e co-cultura e não houve diferença na concentração de ácido láctico, glicerol e xilitol entre os ciclos fermentativos de ambas as condições.

*L. fermentum* é uma BAL heterofermentativa, desta forma produz como produto: ácido láctico, ácido acético e etanol. Nesse trabalho verificou-se a baixa produção de ácido láctico e ácido acético. Basso et al (2014) realizaram o estudo de fermentações em co-cultura de *S. cerevisiae* CAT-1 com *L. fermentum* FT 230-B (heterofermentativa) em meio com 20 % de ART (açúcares totais) obtidos através da razão 50:50 caldo de cana: melaço. Assim como nesse trabalho os autores verificaram uma baixa produção de ácido láctico pelo *L. fermentum*, onde nas fermentações em co-cultivo com a CAT-1 após 24 h a concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) correspondeu a  $0,83 \pm 0,14$  de lactato e  $0,37 \pm 0,03$  de acetato. Sem a presença das BALs, após 24 h não houve a produção de ácido láctico pela levedura e a concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de acetato foi equivalente a  $0,10 \pm 0,01$ .

Conforme Lopes et al. (2016), durante o processo de fermentação industrial a levedura é exposta a condições de estresse, como a utilização de tratamento ácido para o controle da contaminação. Em resposta a essas condições, mecanismos de respostas são acionados, tais como a produção de ácido succínico e glicerol, o qual realiza o controle da contaminação e a proteção do estresse osmótico, respectivamente. Nesse trabalho, a presença do *L. fermentum* na fermentação não influenciou a concentração final desses compostos em 32 h de fermentação.

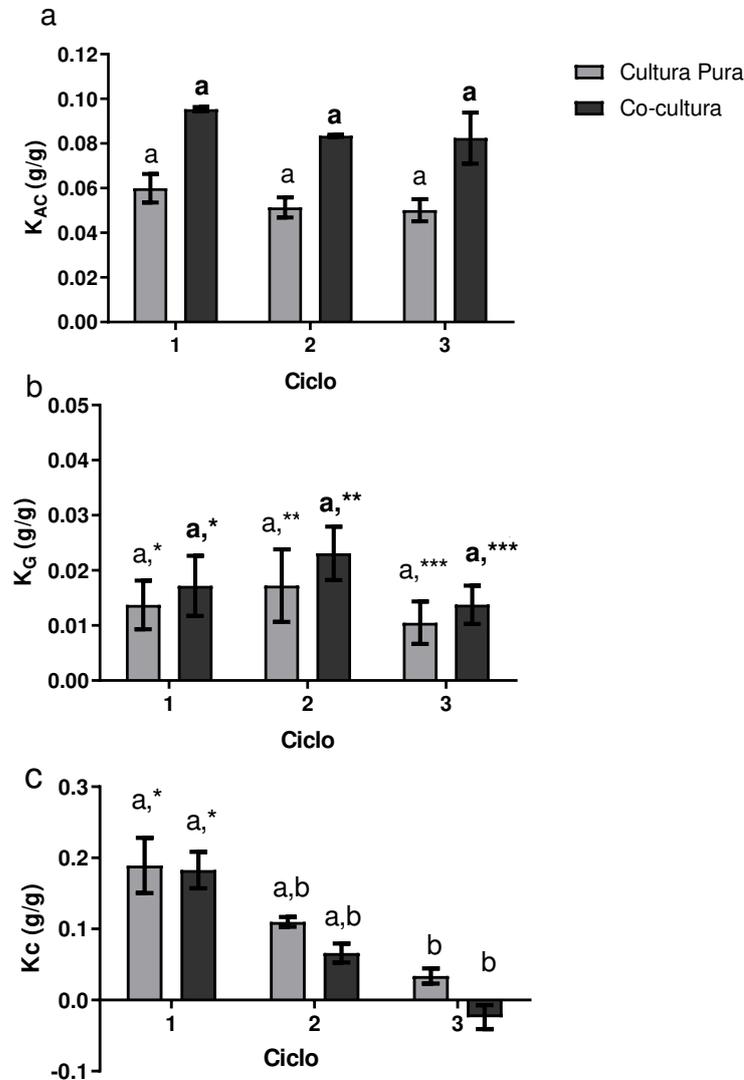
Para fermentações em melaço, Basso et al (2014) verificaram que a presença de *L. fermentum* FT 230 –B resulta no aumento da produção de glicerol pela levedura CAT-1, uma vez que em cultura pura a concentração foi equivalente a  $0,56 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$  e em co-cultura  $0,91 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol, o que pode estar associado à resposta ao estresse causado pela presença de metabolitos da bactéria. Conforme Carvalho-Netto et al (2015) a produção de glicerol pelas células de leveduras é inversamente associada com o título de etanol, entretanto a produção limitada de glicerol é importante para manter o equilíbrio redox e a osmorregulação celular adequada. Desta forma, deseja-se uma produção equilibrada desse composto, que tem que ser baixa o suficiente para ter alto rendimento em etanol e alta o suficiente para tolerar o estresse. Esses autores verificaram que em fermentações na presença de *L. fermentum* a produção de glicerol foi três vezes menor do que na ausência da BAL, o que pode ser um

indicativo que na presença da bactéria a levedura está metabolicamente desbalanceada e desta forma menos tolerante às condições estressantes do ambiente de fermentação.

A eficiência da fermentação pode ser determinada através da razão dos compostos orgânicos (como ácidos, glicerol e célula) por etanol (ARAÚJO et al., 2018). Na Figura 27, têm-se a razão de ácidos totais ( $K_{AC}$ ) (ácido láctico, ácido acético e ácido succínico), glicerol ( $K_G$ ) e célula ( $K_C$ ) por etanol.  $K_{AC}$  nas fermentações em pura cultura variou de 0,05 a 0,06  $g \cdot g^{-1}$  e  $K_G$  variou de 0,01 a 0,02  $g \cdot g^{-1}$ . No estudo desenvolvido por Araújo et al. (2018) com *S. cerevisiae* PE-2 em fermentações em batelada em melaço, os valores de  $K_{AC}$  variaram de 0,016 a 0,022  $g \cdot g^{-1}$  e  $K_G$  variou de 0,07 a 0,14  $g \cdot g^{-1}$ . A utilização de sistema batelada alimentada ao invés de batelada diminui o valor de  $K_G$  (ALFERONE et al., 2002). Os baixos valores de  $K_G$  nesse trabalho podem estar associados ao sistema utilizado (batelada alimentada) e com o metabolismo balanceado da levedura. O valor de  $K_C$  é também utilizado como forma de medir a eficiência do processo fermentativo de produção de etanol, em um processo otimizado o valor de  $K_C$  deve variar de 0,04 a 0,05 (ARAÚJO et al. 2018 citando ANDRIETTA et al. 2012).

Neste trabalho os valores de  $K_c$  diminuíram com o passar dos ciclos fermentativos ( $p < 0,05$ ), a ponto de os valores obtidos no último ciclo fermentativo (3° ciclo) estarem dentro da faixa para processos otimizado. Comparando-se fermentações em co-cultura com cultura pura tem-se menores valores  $K_C$  para os ciclos 2 e 3 em co-cultura ( $p < 0,05$ ).

Figura 27. Razão de ácidos totais ( $K_{AC}$ ) (ácido acético, ácido lático, ácido succínico), glicerol ( $K_G$ ), célula ( $K_C$ ) por etanol em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). a)  $K_{AC}$ , b)  $K_G$  e c)  $K_C$ .



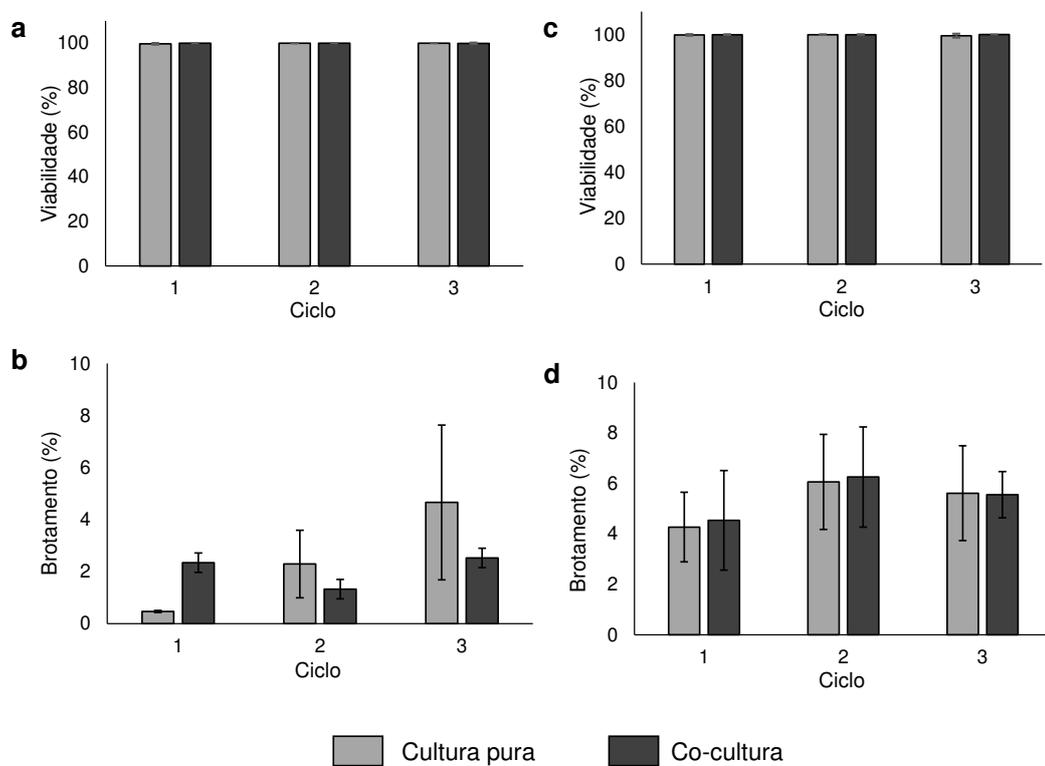
<sup>a, b</sup> Teste estatístico realizado entre os ciclos (ciclo 1 x ciclo 2 x ciclo 3) da mesma condição (cultura pura ou co-cultura). \*, \*\*, \*\*\* Teste estatístico realizado entre as condições (cultura pura x co-cultura) em um mesmo ciclo (ciclo 1 ou ciclo 2 ou ciclo 3). Médias com o mesmo símbolo ou letra em cada coluna não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Tukey. (Médias analisadas em triplicata).

#### 5.4. Manutenção celular da *S. passalidarum* e *L. fermentum* em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

Na Figura 28, demonstra-se a viabilidade (%) e brotamento (%) de *S. passalidarum* para fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

Por meio da figura é possível verificar que a contaminação por *L. fermentum* I2 e o tratamento ácido aplicado não tiveram efeito sobre a viabilidade de *S. passalidarum*, pois em ambas as condições a viabilidade (%) ficou em torno de 99 %. Em relação ao brotamento (%), verifica-se que a levedura apresentou crescimento, uma vez que no tempo de 32 h apresenta brotamento variando de 4 a 6 %.

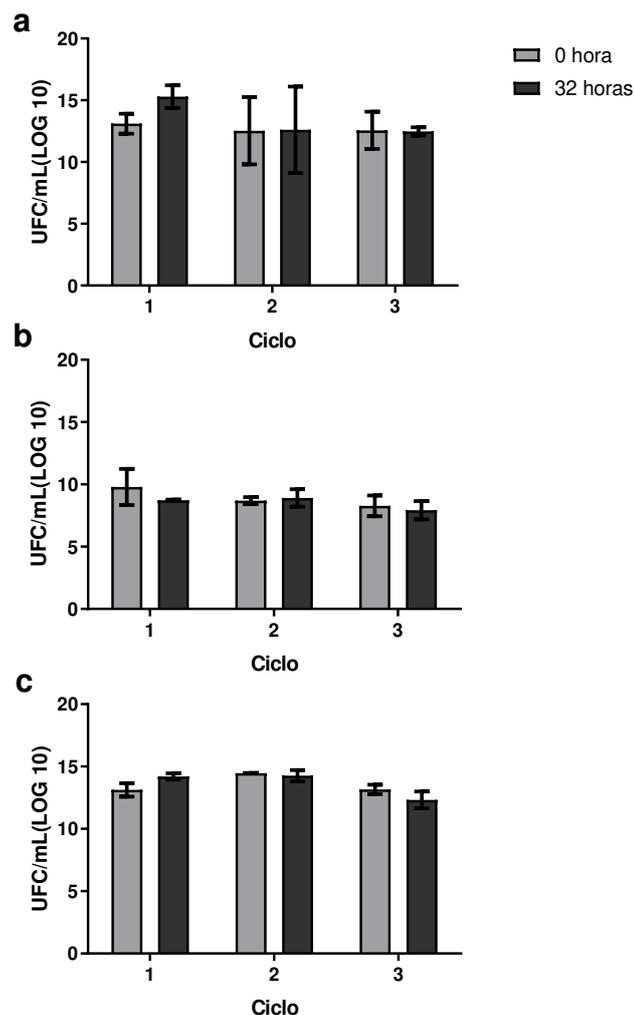
Figura 28. Viabilidade (%) e brotamento (%) de *S. passalidarum* em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum* I2). a) Viabilidade (%) - 0h; b) Viabilidade (%) - 32 h; c) Brotamento (%) - 0 h; d) Brotamento (%) - 32 h



Na Figura 29, apresenta-se a concentração de *L. fermentum* no início (t=0 h) e término (t=32 h) da fermentação em co-cultura com *S. passalidarum*. Em todos os ciclos fermentativos a concentração da bactéria manteve-se em  $10^8$  UFC/ mL. A aplicação do tratamento ácido conforme Nakanishi et al. (2017) não foi suficiente para a redução de ciclos decimais, entretanto não se verificou aumento com o passar dos ciclos fermentativos. O tratamento ácido utilizado nesse projeto de pesquisa é mais brando do que utilizado industrialmente, uma vez que nas usinas brasileiras utilizam-se tempos de 2-3 h. Conforme Costa et al (2018) a aplicação do tratamento ácido ajuda a realizar o controle da população de bactérias, entretanto não realiza a completa eliminação.

No trabalho desenvolvido por Basso et al (2014), em condições industriais e em co-cultura de *S. cerevisiae* CAT-1 e BAL, a concentração de *L. fermentum* FT 230- B aumenta com o passar dos ciclos celulares. A concentração de *S. passalidarum* no pé-de-cuba utilizado nesse trabalho ficou em torno de  $10^{13}$  UFC/ mL. A presença do *L. fermentum* não afetou a concentração da levedura em três ciclos fermentativos. Esse resultado foi consistente com Bassi et al (2018), no qual os autores estudaram o desenvolvimento da *S. cerevisiae* em co-cultura com *L. fermentum* e/ou *D. bruxellensis*, sendo o desenvolvimento da levedura afetado apenas pela presença de ambos os microrganismos

Figura 29. Contagem de *S. passalidarum* e *L. fermentum* na base de LOG<sub>10</sub> para fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). a) *S. passalidarum* em cultura pura; b) *L. fermentum* em co-cultura; c) *S. passalidarum* em co-cultura.



## 5.5. Secretoma

A caracterização das proteínas no meio fermentativo foi realizada com o objetivo de determinar proteínas secretadas pela levedura em resposta à contaminação bacteriana. Na Tabela 7, apresentam-se as proteínas secretada por *S. passalidarum* em relação aos ciclos fermentativos (ciclo 1 e 3) e ao tempo (0, 16, 32 h) em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*). As proteínas identificadas são apresentadas conforme o código de acesso do Uniprot (banco de dados utilizado nesse projeto).

Tabela 7. Proteínas secretadas por *S. passalidarum* ( $p < 0,05$ ) em relação aos ciclos fermentativos (ciclo 1 e 3) e tempo (0, 16 e 32 h) em fermentações em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*) (análises realizadas em triplicata). \* Análise em duplicata.

<i>S. passalidarum</i>					
Ciclo 1			Ciclo 3		
0 h	16 h	32 h	0 h	16 h	32 h
G3AJF2	G3AJF2	G3AJF2	G3AQ23	G3AQ23	G3AQ23
G3AVS3	G3AVS3	G3AVS3	G3AG46	G3AG46	G3AVS3
G3AM45	G3AEZ0	G3AEZ0		G3AVS3	G3AJF2
G3AEZ0	G3AGS4			G3AJF2	G3AEZ0
<i>S. passalidarum</i> + <i>L. fermentum</i>					
Ciclo 1			Ciclo 3		
0 h	16 h	32 h	0 h*	16 h	32 h
G3AJF2	G3AJF2	G3AJF2	G3AQ23	G3AQ23	G3AQ23
G3AVS3		G3AVS3	G3AG46	G3AG46	G3AG46
			G3AEZ0	G3AVS3	G3AVS3
				G3AJF2	G3AJF2
				G3AEZ0	G3AEZ0
					G3AGS5
					G3ALU1

Na Tabela 8, apresentam-se o código de acesso, nome (ou classe da proteína), função molecular, função biológica e o status da proteína. A literatura para secretoma e proteômica de *S. passalidarum* é escassa, desta forma a existência dessas proteínas foi determinada por homologia (existência provável devido a genes ortólogos em espécies próximas) ou foram previstas (sem base em nível de proteína, transcriptômica ou por homologia).

Tabela 8. Caracterização das proteínas secretadas pela *S. passalidarum* em relação a função molecular e função biológica.

Código de acesso (Uniprot)	Nome	Função molecular	Função Biológica	Status*
G3AQ23	Glucoamilase 1	Atividade hidrolítica Hidrolise de compostos O-glicosil	Metabolismo de carboidratos	Proteína definida por homologia
G3AM45	Não caracterizado	Atividade hidrolítica Hidrolise de compostos O-glicosil	Metabolismo de carboidratos	Proteína definida por homologia
G3AVS3	Não caracterizado	Não caracterizado	Não caracterizado	Proteína prevista
G3AJF2	Não caracterizado DAN4	**Gene DAN4 – Constituinte da parede celular	Organização da parede celular	Proteína prevista
G3AEZ0	Exo- $\beta$ -glucanase	Atividade hidrolítica Hidrolise de compostos O-glicosil	Metabolismo de carboidratos	Proteína definida por homologia
G3AGS4	Não caracteriza	Atividade 1-3- $\beta$ - glucanotransferase Atividade endo-1-3- $\beta$ - glicosidade glucana	Metabolismo de carboidratos Organização da parede celular	Proteína definida por homologia
G3AG46	Não caracterizada	Não caracterizada	Não caracterizada	Proteína prevista
G3ALU1	Não caracterizada	Atividade hidrolítica	Catabolismo de nucleotídeo	Proteína prevista
G3AGS5	Não caracterizada	Atividade hidrolítica Hidrolise de compostos O-glicosil Transferase Transferência de grupos glicosilados	Metabolismo de quitina da parede celular Organização da parede celular	Proteína prevista

\* Status: Evidência experimental no nível de proteína, Evidência experimental no nível de transcriptômica, Proteína definida por homologia, Proteína prevista e Proteína incerta.

\*\* Baseado na *S. cerevisiae*.

Referência: UNIPROT, 2018

No primeiro ciclo fermentativo, em ambas as condições as proteínas identificadas por G3AJF2 e G3AVS3 aparecem nas amostras independentemente do tempo fermentação, com exceção do tempo 16 h para fermentações em co-cultura (Tabela 7). G3AJF2 é uma proteína relacionada com o gene DAN4 que participa da constituição da parede e G3AVS3 é uma proteína prevista a qual não se caracterizou as funções moleculares e biológicas (UNIPROT, 2018). Nas fermentações em cultura pura as proteínas G3AM45, G3AGS4 e G3AEZ0 foram identificadas, entretanto, essas proteínas não são encontradas nas amostras em co-cultura (Tabela 8). Essas proteínas possuem atividade hidrolítica e atuam no metabolismo de carboidratos (UNIPROT, 2018).

No terceiro ciclo fermentativo, proteínas que atuam no metabolismo de carboidratos são identificadas nas fermentações em cultura pura e co-cultura (Tabela 8). As proteínas G3AGS5 e G3ALU1 são identificadas apenas nas amostras da fermentação em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*) (Tabela 7). G3AGS5 possui como característica a atuação no metabolismo da quitina e/ou organização da parede celular e G3ALU1 possui atividade hidrolítica e atua no catabolismo de aminoácidos (UNIPROT, 2018).

A parede celular de fungos é uma estrutura complexa composta por quitina, 1-3  $\beta$  e 1-6  $\beta$  glucano, manose e proteínas, essa composição é altamente dinâmica e muda constantemente durante a divisão celular, crescimento e morfogênese. Enzimas hidrolíticas, estão intimamente associadas com a parede celular e a maioria possui atividade quitinases e glucanase, que atuam na manutenção da plasticidade e na quebra e religação dos componentes da parede celular (ADAMS, 2004).

A realização de um maior número de ciclos celulares poderia trazer maior esclarecimento sobre o efeito da contaminação por *L. fermentum* I2 nos parâmetros fermentativos de *S. passalidarum*, pois existe alteração do perfil de proteínas no meio quando compara-se o ciclo 1 com o ciclo 3 e as fermentações em cultura pura e co-cultura.

Os dados obtidos no Q-tof também foram confrontados com banco do *L. fermentum*. As proteínas identificadas não apareceram em triplicata nas amostras ( $p < 0,05$ ), demonstrando a ausência de um perfil de proteínas secretadas pela bactéria em resposta à presença da levedura. As proteínas referentes a bactéria são frutos da lise celular e são apresentadas na Tabela 9

Tabela 9. Proteínas de *L. fermentum* I2 ( $p < 0.05$ ) em fermentações em batelada alimentada em meio sintético 70:30 glicose: xilose para fermentações em co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum*).

<b>Código de acesso</b> (Uniprot)	<b>Nome</b>	<b>Função Biológica</b>	<b>Função Molecular</b>	<b>Status</b>
A0A0N7CR62	Topoisomerase I	DNA topoisomerase com atividade tipo I	Alteração da topologia do DNA	Proteína prevista
A0A2M8MQ99	Topoisomerase III	DNA topoisomerase com atividade tipo I	Alteração da topologia do DNA	Proteína prevista
C0WXQ0	Fator de alongamento Tu	Promove a ligação GTP-dependente do Aminoacil-tRNA ao “sitio A” do ribossoma durante a biossíntese da proteína	Atividade GTPase Ligação a GTP Fator de alongação e translação	Proteína definida por homologia
A0A0F4HEL1	Enolase	Ligação ao íon magnésio Atividade Fosforo Piruvato hidratase	Atua na Glicólise	Proteína definida por homologia
A0A0F4HEZ1	Proteína 50 s ribossomal	Ligação ao rRNA	Constituinte estrutural do ribossoma	Proteína definida por homologia
A0A0N6WH00	Dehidrogenase álcool-aldeído	Atividade dehidrogenase acetaldeído Atividade álcool dehidrogenase Ligação à íons metálicos	Processo metabólico de álcool Utilização de carbono	Proteína definida por homologia

---

A0A00F7CHW2	Fator de alongamento Tu	Promove a ligação GTP-dependente do Aminoacil-tRNA ao “sitio A” do ribossoma durante a biossíntese da proteína	Atividade GTPase Ligação a GTP Fator de alongação e translação	Proteína definida por homologia
A0A1L7GT47	Fator de alongamento Tu	Promove a ligação GTP-dependente do Aminoacil-tRNA ao “sitio A” do ribossoma durante a biossíntese da proteína	Atividade GTPase Ligação a GTP Fator de alongação e translação	Proteína definida por homologia
A0A40HDM4				
A0A0F4HBZ6	Gliceraldeído-3P desidrogenase	Atividade gliceraldeído-3P desidrogenase	Processo metabólico da glicose	Proteína definida por homologia
A0A0F4HAA7	Dehidrogenase D-Lactato	Atividade dehidrogenase D-Lactato Ligação ao NAD	Oxirredutase	Proteína definida por homologia
A0A158SL49	Síntese de ATP – subunidade b	Síntese de ATP	Síntese de ATP e transporte de elétrons	Proteína definida por homologia
A0A0F4HDE1	Proteína ribossomal S14 tipo Z	Ligação ao rRNA Constituinte estrutural do ribossoma Ligação ao íon zinco	Translação	Proteína definida por homologia
A0A0F4HCZ2	Dehidrogenase L-lactato	Atividade dehidrogenase L-lactato	Glicólise	Proteína definida por homologia

---

---

A0A0N7CKF5	Fosfoquetolase	Aldeídotase	Metabolismo de carboidratos	Proteína definida por homologia
A0A0F4HDJ0	Proteína ribossomal 30 S S9	Constituinte do ribossoma	Tradução	Proteína definida por homologia
A0A1L7GXA1	Endonuclease Cas 3	Helicase Deoxiribonuclease Endonuclease	Defesa ao vírus	Proteína prevista
A0A0N6WH72	Integrase	Ligação ao DNA	Integração do DNA Recombinação do DNA	Proteína definida por homologia
A0A1Q2T7X6	Integrase	Ligação ao DNA	Integração do DNA Recombinação do DNA	Proteína definida por homologia
A0A0G9G2T5	Proteína de superfície extracelular	Proteína de superfície extracelular	Proteína de superfície extracelular	Proteína prevista
A0A0N7CH97	Peptidase M23B	Peptidase M23B	Peptidase M23B	Proteína prevista

---

## CAPÍTULO 5- CONCLUSÃO

*L. fermentum* é uma BAL comumente encontrada no processo de produção de etanol 1G e devido a sua capacidade de se desenvolver em diferentes ambientes é descrito na literatura que essa bactéria possui a capacidade de consumir e crescer em diferentes açúcares. O consumo de açúcares e crescimento de *L. fermentum* I2 foi avaliado em três meios distintos: MRS + xilose (glicose, xilose), melação (glicose, frutose e sacarose) e meio sintético (glicose e xilose). Em MRS + xilose e melação, essa bactéria foi capaz de crescer e consumir os açúcares, entretanto, não possui a mesma capacidade em meio sintético. Glicose e xilose são os açúcares majoritários do hidrolisado lignocelulósico, que é a matéria-prima para produção de bioetanol 2G. Nesse trabalho, verificou-se que *L. fermentum* I2 possui a capacidade de consumir simultaneamente glicose e xilose em meio rico em nutrientes (MRS + xilose), o que pode representar um problema para o processo de bioetanol 2G, devido ao desvio desses açúcares da produção de etanol para ácidos orgânicos.

Embora *L. fermentum* I2 não tenha tido a capacidade de crescer em meio sintético (glicose e xilose) na ausência da levedura, esse meio foi utilizado nas fermentações em sistema batelada alimentada com reuso celular em cultura pura (*S. passalidarum*) e co-cultura (*S. passalidarum* + *L. fermentum* I2). Em co-cultura com *S. passalidarum*, *L. fermentum* I2 possui a capacidade de remanescer no processo e consumir os açúcares, uma vez que a concentração de bactéria permaneceu em  $10^8$  UFC/ mL ao longo dos três ciclos fermentativos e verificou-se a produção de ácido láctico em concentrações de 0,82 à 0,63 g.L<sup>-1</sup> em 32 h de fermentação. O tratamento ácido foi utilizado nesse projeto para o controle da contaminação por *L. fermentum* I2, contudo, verificou-se que o tratamento ácido aplicado não foi capaz de reduzir número de ciclos decimais da bactéria. Em um meio livre de inibidores, como o utilizado nesse trabalho, o desenvolvimento da bactéria na presença da levedura pode estar associado ao fornecimento de nutrientes da levedura para a bactéria.

No processo de produção de bioetanol 1G, a contaminação bacteriana está associada com a perda de viabilidade da levedura, floculação e diminuição no rendimento da produção de etanol. No processo fermentativo de bioetanol 2G utilizando a levedura *S. passalidarum* não se verificou perda de viabilidade da levedura ou presença de floculação. Em relação aos parâmetros fermentativos apenas o consumo de xilose ( $p < 0,05$ ) foi afetado negativamente, entretanto, não se verificou diferença no rendimento de etanol. Desta forma, nas condições analisadas *S. passalidarum* demonstrou ser resistente a contaminação por *L. fermentum* I2.

Em relação à secreção de proteínas, *S. passalidarum* secretou as proteínas G3AGS5 e G3ALU1 na presença de *L. fermentum* I2, que estão respectivamente relacionadas ao catabolismo de amino ácidos e metabolismo de quitina e organização celular. *L. fermentum* I2 não apresentou a secreção de enzimas na presença de *S. passalidarum*, sendo as proteínas encontradas no mosto de fermentação fruto da lise celular.

Nas condições testadas não foi verificado efeito do *L. fermentum* I2 na viabilidade e parâmetros fermentativos de *S. passalidarum*, contudo, o estudo de secretoma indica que ao longo dos ciclos fermentativos houve diferença na secreção de proteínas. Desta forma, a realização de um número maior de ciclos fermentativos poderia trazer maior esclarecimento para esse estudo.

## SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Partindo-se desse trabalho sugere-se como trabalhos futuros:

- 1- Analisar o efeito dos inibidores ácido acético, ácido fórmico, HMF e furfural sobre o crescimento e consumo de açúcares por BALs;
- 2- Avaliar *L. brevis*, *L. plantarum* e *Acetobacter* como possíveis contaminantes do processo 2G;
- 3- Estudar o efeito da contaminação por BALs em sistema contínuo de fermentação;
- 4- Avaliar diferentes tempos de aplicação de tratamento ácido em relação ao controle da contaminação por *L. fermentum* e viabilidade celular da *S. passalidarum*;
- 5- Avaliar o secretoma de *S. passalidarum* em meios contendo diferentes açúcares com arabinose e celobiose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, A.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Ethanol production improvement driven by genome-scale metabolic modeling and sensitivity analysis in *Schefferymyces stipis*. **PLOS ONE**. v. 12, p.1-26, 2017.
- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitanases and glucanases. **Microbiology**. v. 150, p. 2029-2035, 2004.
- ALBERS, E.; JOHANSSON, E.; FRAZÉN, C. J.; LARSSON, C. Selective suppression of bacterial contaminants by process conditions during lignocellulose based yeast fermentation. **Biotechnology for Biofuels**. v.4, p. 59-66, 2011.
- ALFERONE, S.; MOLINA-JOUVE C.; GUILLOUET, S.E.; URIBELARREA, J.L.; GOMA, G.; BENBADIS, L. Improving ethanol production and viability of *Saccaromyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology and biotechnology**. v. 60, p. 67-72, 2003.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- ARAÚJO, T. M.; SOUZA, M. T.; DINIZ, R.S.H.; YAMAKAWA, C. K.; SOARES, L. B.; IENCZAK, J. L.; DE OLIVEIRA CASTRO J.V.; GOLDMAN, G. H.; BARBOSA, E.A.; CAMPOS, A.C.S; CASTRO, I.M.; BRANDÃO R.L. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 111, p. 1749-1766, 2018.
- BARBOSA, A. C.; CADETE, R. M., GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Candida materiaesp. nov.*, a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V.59, p.2104-2006, 2009.
- BASSI, A. P. G.; MENEGUELLO, L.; PARALUPPI, A. L.; SANCHES, B. C. P.S.; CECCATO-ANTONINI. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae*-*Lactobacillus fermentum*-*Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1056-2>.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brasil. **FEMS Yeast**. v.8, p.1155-1163, 2008.

BASSO, T. O.; GOMES, S. F.; LOPES, M. L.; AMORIM, H. V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 105, p. 169-177, 2014.

BECKENER, M.; IVEY, M.; PHISTER, T. Microbial contamination of fuel ethanol fermentation. **Letters in Applied Microbiology**. v.53, p.387-394, 2011.

BISCHOFF, K.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHING, R. E.; RICH, J. O. Modeling Bacterial Contamination of Fuel Ethanol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 103, p. 117-122, 2009.

BONATELLI, M. L.; QUECINE, M. C.; SILVA, M. S.; LABATE, C. A. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. **FEMS**. v.364, p. 1-8, 2017.

BREXÓ, R.; SANT'ANA, A. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 73, p.424-434, 2017.

CADETE, R. M.; LAS HERAS, A. M.; SANDSTRÖM, A. G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M.; ROSA, C. A.; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.9, p.167-181, 2016.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C. F.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysate, Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2012, p.1-15, 2012.

CARPIO, L. G. T.; SOUZA, F. S. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**. v.111, p.771-780, 2017.

CARVALHO, D. M.; QUEIROZ J. H.; COLODETTE, J. L. Assessment of alkaline pretreatment for the production of bioethanol from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**. v.94, p.932-941, 2016.

CARVALHO, D. M.; SEVASTYANOVA, O.; PENNA, L.S.; SILVA, B.P.; LINDSTRÖM, M. E.; COLODETTE, J. L. Assessment of chemical transformation in eucalyptus sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**. V.73, p.118-126, 2015.

CARVALHO-NETTO, O. V.; CARAZZOLLE, M. F.; MOFATTO, L.S.; TEXEIRA, P. J. P. L.; NORONHA, M. F.; CALDERÓN, L. A. L.; MIECZKOWSKI, P. A.; ARGUESO, J. L.; PEREIRA, G. A. G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial cell factories**. v.14, p.1-13, 2015.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.4- Safra 2017/2018- n° 4. Disponível: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 20. Dez. 2018.

CORTÁZAR, A. R.; ARANSAY, A. M.; ALFARO, M.; OGUIZA, J. A.; LAVÍN, J. L. SECRETOOL: integrated secretome analysis tool for fungi. **Amino Acids**. v. 46, p.471-473, 2014.

COSTA, M.A.S.; CERRI, B.C.; CECCATO- ANTONINI. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**. v.66, p. 77-85, 2017.

DUSSÁN, K. J., SILVA, D. D. V.; PEREZ, V. H.; SILVA, S. S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production in a batch bioreactor using two strain of xylose- fermenting yeast. **Renewable Energy**. v.87, p. 703-710, 2016.

DUTTA, S.; WU, K. C.W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**. v.16, p.4615-4626, 2014.

FITZPATRICK, J.J.; O'KEEFFE, U. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Process Biochem**. v.37, p.183–186, 2001.

FUGELSANG, K.C.; EDWARDS C.G. Fermentation and Post-Fermentation Processing. In: *Wine Microbiology*. Boston: Springer, 2007, p.115-138.

GIARDINA, B. J.; STANLEY, B. A.; CHIANG, H-L. Glucose induces rapid changes in the secretome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proteome Science**. v.9, p.1-21, 2014.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infections Diseases**. v.60, S98-S107, 2015.

GOMBERT, A. K.; MARIS, A. J. A. V. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1<sup>st</sup> generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**. v.33, p. 81–86, 2015.

GOTTSCHALK, L. M. ; BOM, E. P. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in hydrolyses of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**. v.51, p. 72-78, 2010.

GREENBAUM, D.; LUSCOMBE, N. M.; JANSEN, R.; QUIAN, J.; GERSTEIN, M. Interrelating different types of genomic data, from Proteome to Secretome: “ Oming in on Function”. **Genome Research**. p.1463-1468, v.11, 2001.

HAHN-HÄGERDAS, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND. Towards industrial pentose-fermenting yeast strain. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.74, p.937-953, 2007.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 94, p. 205-2014, 2012.

HOU, X.; SHUO, Y. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied microbial and cell physiology**. v. 93, p. 2591-2601, 2012.

HUANG, C; DAMASCENO, L. M.; ANDERSON, K. A.; ZHANG, S.; OLD, L.; BATT, C. A. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol- induced cultures. **Applied microbiology biotechnology**. v.90, p.235-247, 2011.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**. v. 2016, p.103-112, 2016.

KARP, E. M.; RESCH, M. G.; DONOHOE, B. S.; CIESIELSKI, P. N.; O’ BRIEN, M. H.; NILL, J. E.; MITTAL, A.; BIDDY, M. J.; BECKHAM, G. T. Alkaline pretreatment of Switchgrass. **ACS Sustainable Chemistry&Engineering**. v. 3, p. 1479-1491, 2015.

KAUPERT, A. A. N.; BORIN, G. P.; GOLDMAN, G. H.; DAMÁSIO, A. R. L.; OLIVEIRA, J. V.C. Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*. **FEMS Yeast Research**. v.16, p.1-16, 2016.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & engineering chemistry research**. v.48, p. 3713-3729, 2009.

KWAK, S; JIN,Y. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microbial Cell Factories**. v.16, p. 82-97, 2017.

LIMA, D. A.; LUNA, R. L. N.; MARTÍN, C.; GOUVEIA, E. R. Comparison of bioethanol production from acid hydrolyzates of waste office paper using *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum*. **Cellulose Chemistry and Technology**. v. 49, p.463-469, 2015.

LONG, T.; SU, Y.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. Cofermentation of Glucose, Xylose, and Cellobiose by the Beetle Associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.78, p.5492-5500, 2012.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H. B. N.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 64-76, 2016.

LUCENA, B. T. L.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L.S.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A. THOMPSON, F. L.; MORAIS, M. A. J. Diversity of latic acid bacteria of the bioethanol process. **BCM Microbiology**. v.10, p.290-298, 2010.

MACRELLI, S.; MOGENSE, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2<sup>nd</sup> generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for biofuels**. v. 5, p. 1-22, 2012.

MATTANOVICH, D.; GRAF, A.; STADLMANN, J.; DRAGOSITS, M.; REDL, A.; MAURER, M.; KLEINHEINZ, M.; SAUER, M.; ALTMANN, F.; GASSER, B. Genome,

secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**. v.8, p.29-42, 2009.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Renovabio. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/1138769/0/P%26R++RenovaBio.pdf/a29044a3-6315-4845-80d8-832852efbb7f>>. Acesso em: 18 de Setembro de 2018.

MORALES, P.; GENTINA, J. C.; AROCA G.; MUSSATO, S. I. Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. **Industrial Crops and Products**. v.106, p.5-11, 2017.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**. v.27, p.229-245, 1999.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v.96, p.673-686, 2005.

MOURA, P; BARATA, R.; CARVALHEIRO, F.; GÍRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; ESTEVES, M. P. *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strain. **LWT-Food Science and Technology**. v. 40, p. 963-972, 2007.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 37, p.351-370, 2011.

MUTHAIYAN, A.; RICKE, S. C. Current perspective on detection of microbial contamination in bioethanol fermenters. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 5033-5042, 2010.

NAKANISHI, S. C.; SOARES, B. L.; BIAZI, L. E.; NASCIMENTO, V. M.; COSTA, A. C.; ROCHA, G. J. M., LENEZAC, J. L. Fermentation Strategy for Second Generation Ethanol Production From Sugarcane Bagasse Hydrolysate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**. v.9999, p.1-11, 2017.

NGUYEN, N. H.; SUH S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL M. Morphological and ecological similarities: Wood-boring beetles associated with novel xylose fermenting yeast,

*Spathaspora passalidarum*gen. sp. nov and *Candida jeffriessi* sp nov. **Mycological Research**. v.110, p. 1231-1241, 2006.

OLIVA- NETTO, P. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por levedura. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese de doutorado.

PALMQVIST, B. Processing Lignocellulosic Biomass into Ethanol. 2014. 73 f. Doctoral dissertation. Faculty of Engineering of Lund University.

PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. de. Microrganismos na Produção de Etanol: Fermentação de Pentoses e Hexoses. In: \_\_\_\_\_ Microrganismos na Produção de Combustíveis Líquidos. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2013. p. 23-31.

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**. v.33, p. 1091-1107, 2015

RABELLO, C. R. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Tese de doutorado.

REIS, V. R.; BASSI, A. P.G. BASSI; ALMEIDA, A. R.; CARVALHO, I.G.B.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Express**. v.8, p.1-23, 2018.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION- RFA. Industry Statistics. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>> Acesso em: 17 de setembro de 2018.

ROACH, D. R.; KHATIBI, P. A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. R.; DONOVAN, D. M. Bacteriophage-encoded lytic enzymes control growth of contamination *Lactobacillus* found in fuel ethanol fermentations. **Biotechnology for biofuels**. v.6, p.20-31, 2013.

ROCHA, G.J.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONÇALVES, A.R.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**. v.64, p.52-58, 2015.

- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**. v.454, p.841-845, 2008.
- SÁNCHEZ, B.; CHAIGNEPAIN, S.; SCHMITTER, J.; URDACI, M. C. A method for the identification of proteins secreted by lactic acid bacteria grown in complex media. **FEMS Microbiology letters**. v.295, p.226-229, 2009.
- SANTOS, L. V.; GRASSI, M. C. B.; GALLARDO, J. C. M; PIROLLA, R. A. S.; CALDERÓN, L. L.; CARVALHO-NETTO, O. V.; PARREIRAS, L. S.; CAMARGO, E. L. O. C.; DREZZA, A. L.; MISSAWA, S. K.; TEXEIRA, G. S.; LUNARDI, I.; BRESSIANI, J.; PEREIRA, G. A. G. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**. v. 12, p. 40-57, 2016 a.
- SANTOS, S. C.; DIONÍSIO, S. R.; DE ANDRADE, A. L. D.; ROQUE, L. R.; DA COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Fermentation of xylose and glucose mixture in intensified reactors by *Scheffersomyces stipitis* to produce ethanol. **International Scholarly and Scientific & Innovation**. v.9, 539-544, 2015.
- SANTOS, S. C; SOUZA, A. S.; DIONÍSIO, S. R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F. M.; ROSSELL, C. E. V.; COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**. v.219, p. 319-329, 2016 b.
- SCHELL, D. J.; DOWE, N.; IBSEN, K. N.; RILEY, C. J.; RUTH, M. F.; LUMPKIN, R. E. Contamination occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Bioresource Technology**. v.98, p.2942-2948, 2007.
- SHINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass- An overview. **Bioresource Technology**. v. 199, p.76-82, 2016.
- SILVEIRA, M. H. L.; MORAIS, A. R. C.; LOPES, A. M. C.; OLEKSZYSZEN, D. N.; BOGEL-LUKASIK, R.; ANDREAUS, J.; RAMOS, P. L. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. **ChemSusChem**. v.8, p.3366-3390, 2015.
- SMEEKENS, J. M.; XIAO, H.; WU, R. Global analysis of secreted proteins and glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of proteome research**. v.16, p.1039-1049, 2017.

SU, Y.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T.W. Effects of Aeration on Growth, Ethanol and Polyol Accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**. v.112, p. 457-469, 2015.

UNIPROT. Disponível: < <https://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 03. Jan. 2019

VERAS, H. C. T.; PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. Comparative assessment of fermentative capacity of diferente xylose-consuming yeast. **Microbial Cell Factories**. v.16, p.1-8, 2017.

WHEALS, A. E; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**. v. 17, p.482-487, 1999.

WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, V. B.; DALE, B. E.; ZINKEL, R.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASH, A. P. Comparative genimosc of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the national academy of Science of the United States of America**. v.108, p.13212-13217, 2011.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.66, p. 751-774, 2016.

ZHANG, C.; GUO, T.; XIN, Y.; GAO, X.; KONG J. Catabolite responsive element deficiency of xyl operon resulting in carbon catabolite derepression in *Lactobacillus fermentum 1001*. **Journal of Applied Microbiology**. v.120, p. 126-137, 2016.