

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Tese

**Avaliação comparativa do
processo auto-fermentativo e
bioaumentado de diferentes
amostras de bagaços de cana-
de-açúcar: identificação da
microbiota autóctone e
produtos gerados.**

Isabela Morato de Souza

Ouro Preto
2023



UFOP

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PROCESSO AUTO-FERMENTATIVO E
BIOAUMENTADO DE DIFERENTES AMOTRAS DE BAGAÇOS DE CANA-
DE-AÇÚCAR: IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA AUTÓCTONE E
PRODUTOS GERADOS**

ISABELA MORATO DE SOUZA

Proposta de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito à obtenção do título de doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientador: Dra. Silvana de Queiroz Silva

Coorientador: Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel

Ouro Preto

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S729a Souza, Isabela Morato de.
Avaliação comparativa do processo auto-fermentativo e bioaumentado de diferentes amostras de bagaços de cana-de-açúcar [manuscrito]: identificação da microbiota autóctone e produtos gerados. / Isabela Morato de Souza. - 2023.
123 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva.
Coorientadora: Profa. Dra. Leandro Vinicius Alves Gurgel.
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Biotecnologia. 2. Produtos biológicos. 3. Compostos orgânicos. 4. Bagaço de cana. I. Silva, Silvana de Queiroz. II. Gurgel, Leandro Vinicius Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 604

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabela Morato de Souza

Avaliação comparativa do processo auto-fermentativo e bioaumentado de diferentes amostras de bagaços de cana-de-açúcar: identificação da microbiota autóctone e produtos gerados.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de doutora.

Aprovada em 13 de Novembro de 2023.

Membros da banca

Dra. Silvana de Queiroz Silva - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Valéria Monteze Guimarães - Universidade Federal de Viçosa
Dr. José Augusto Zorel - Universidade Federal de São João del Rey
Dr. Rogério Lopes Brandão - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Elisa da Silva Barreto - Universidade Federal de Ouro Preto

Silvana de Queiroz Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 15/12/2023



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Queiroz Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/12/2023, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0643048** e o código CRC **A539D3D7**.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva, por toda experiência transferida a mim e pela confiança, apoio e paciência durante todas as etapas do projeto. Com toda certeza é um exemplo profissional e pessoal que levarei por toda vida.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel pela disponibilidade e comprometimento com nosso trabalho.

À Profa. Dra. Yasmine Antonini Itabaiana pela colaboração envolvendo as análises estatísticas realizadas.

Aos alunos do LBTM e LQTA que, de alguma forma, colaboraram com meu conhecimento e/ou realização de experimentos. Vocês foram fundamentais!

À Universidade Federal de Ouro Preto pelo suporte e infraestrutura para realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela confiança no projeto e suporte financeiro.

À minha família e amigos, pela parceria, encorajamento e apoio incondicional em todos os momentos. Em especial aos meus pais Patrícia e Manoel, minha irmã Letícia e meus fiéis companheiros Maya e Shake. Sem vocês, com toda certeza, eu não conseguiria.

À minha irmã de alma, Marília, que me acompanha desde a faculdade até meus últimos dias em Ouro Preto e com certeza por toda vida. Sem o seu apoio nada disso faria sentido, obrigada por tudo que fez por mim durante todos esses anos. Você me inspira a ser uma pessoa mais sensível, comprometida e genuína. Seu coração vale ouro.

Ao meu namorado, Túlio, pelo incentivo e companhia, tornando o final desta caminhada mais leve e prazerosa.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um material remanescente da indústria sucroalcooleira considerado fonte renovável, de baixo custo e rico em açúcares. A conversão desta biomassa lignocelulósica em bioprodutos é uma alternativa favorável para amenizar problemas ambientais causados pelo uso excessivo de matéria-prima de origem fóssil, além de contribuir para o conceito de biorrefinaria. Entretanto, devido à sua estrutura recalcitrante, o acesso aos açúcares do biomaterial é um desafio para microrganismos fermentadores. Assim sendo, objetivando alcançar um bioprocesso consolidado, o presente estudo investigou o potencial hidrolítico e fermentativo da microbiota autóctone do BCA bruto durante sua fermentação, bem como a prospecção dos microrganismos presentes na biomassa. Nos ensaios de fermentação foram testadas amostras de BCA de seis usinas (A, B, C, D, E e F) na concentração de 10 g/L, monitoradas por 408 h a 37°C, sob agitação. As cepas cultiváveis foram coletadas no tempo 96 h e três delas (X, Y e Z) foram selecionadas para serem inoculadas individualmente em ensaios bioaumentados. A caracterização metagenômica do consórcio microbiano foi realizada e para quantificação dos metabólitos obtidos durante a fermentação foi feita a análise da fração líquida, enquanto a fração sólida foi caracterizada a fim de determinar os teores de celulose, hemiceluloses e lignina no início e ao final do ensaio. A microbiota presente nos bagaços no início da fermentação incluiu principalmente organismos do gênero *Acetobacter*, ao passo que, com 96 h de ensaio houve predominância de bactérias fermentadoras, como *Clostridium*, *Enterobacter* e *Ruminiclostridium*. Ao final do ensaio a abundância de *Ruminiclostridium* foi expressiva para as amostras analisadas neste momento. Dentre as condições testadas, alcançou-se a remoção de 37% da fração de lignina, 58% de celulose e 44% de hemiceluloses na fermentação do bagaço D por sua microbiota autóctone bioaumentada por *Klebsiella pneumoniae* (isolado X). Os principais produtos obtidos foram ácido caproico (2,81 g/L em Dy), etanol (2,68 g/L em A), ácido acético (1,15 g/L em D), ácido isobutírico (0,97 g/L em E), metanol (0,97 g/L em A) e ácido propiônico (0,34 g/L em C). Isto demonstra o elevado potencial lignocelulolítico da microbiota autóctone do BCA por acessar e fermentar o próprio substrato, demonstrando a possibilidade de obtenção de bioprodutos de valor agregado através do bioprocessos consolidado.

Palavras-chave: Bioprocessos consolidados; microrganismos celulolíticos; etanol celulósico; bioprodutos; biorrefinaria.

ABSTRACT

The raw sugarcane bagasse (RSB) is an effluent from the sugar and alcohol industries considered a low-cost renewable source of energy and highly enriched in sugars. Thus, the conversion of this onto bioproducts is an attractive alternative to lower the environmental impact caused by the excessive use of fossil derived fuels, besides of contributing to the concept of biorefinery. Despite this, due to its recalcitrant structure, the access to the sugars from this material is a challenge for the fermenter microorganisms. Having the goal to achieve a consolidated bioprocess, the present investigation describes both the hydrolytic and fermentative potentials from crude RSB's autochthonous microbiota along its fermentative processes, along with prospecting the microorganisms present into the biomass. On the fermentative assays, RSB's samples derived from six power plants (from A to F), all with a concentration of 10 g/L, were closely monitored for 408 hours at 37° C under constant agitation. The cultivable strains were collected after 96 hours and three of them (X, Y and Z) were selected to be inoculated individually in bioaugmented assays. The metagenomic analysis of the microbiome was developed and to quantify the metabolites obtained during the fermentation, liquid fraction analyses were performed along with the characterization of the solid fraction in order to describe the proportions of cellulose, hemicellulose and lignin at the beginning and end of the assay. The microbiome present at the different bagasse samples starting the fermentation included mainly *Acetobacter* genus microorganisms. Interestingly however, after 96 hours of assay the microbiome shifted to being composed mainly of fermentative bacteria such as *Clostridium*, *Enterobacter* and *Ruminiclostridium*. By the end of the experiment, the abundance of *Ruminiclostridium* genus belonging organisms was expressive for all the three sample. Among the conditions tested, the removal of 37% of the lignin fraction, 58% of cellulose and 44% of hemicellulose was achieved in the fermentation of bagasse D by its autochthonous microbiota bioaugmented by *Klebsiella pneumoniae*. The main products obtained were caproic acid (2.81 g/L in Dy), ethanol (2.68 g/L in A), acetic acid (1.15 g/L in D), isobutyric acid (0.97 g/L in E), methanol (0.97 g/L in A) and propionic acid (0.34 g/L in C). This way, the above-mentioned results evidently show the potential of the RSB's autochthonous microorganisms into not only accessing and fermenting their own substrates, but also obtaining rentable bioproducts by means of a consolidated bioprocess.

Key words: Consolidated bioprocess, cellulolytic microorganisms, cellulosic ethanol, bioproducts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conceito de bioeconomia circular na biorrefinaria lignocelulósica. Traduzido de Banu et al. (2021).....	11
Figura 2. Estrutura e composição da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar. Adaptado de Brethauer et al., (2020).....	17
Figura 3. Polímero de celulose formado por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, com a unidade repetitiva celobiose em evidência. Adaptado de (Okolie <i>et al.</i> , 2020).....	19
Figura 4. Estrutura química das hemiceluloses: (a) diferentes açúcares e ácidos de açúcares de hemiceluloses e (b) possível forma de ligação entre xilose- β -(1,4), manose- β -(1,4), glicose- β -(1,4) e galactose- α -(1,3) formando um fragmento de estrutura das hemiceluloses. Traduzido de Okolie <i>et al.</i> , (2020) e Senatore <i>et al.</i> , (2021).	20
Figura 5. Estrutura química da lignina: (a) álcoois que formam as unidades estruturais básicas da lignina, (b) modelo de ligações entre monômeros de fenilpropano formando a lignina (Me = CH ₃). Traduzido de Wegelius (2018).....	21
Figura 6. Enzimas envolvidas na degradação da celulose durante a hidrólise enzimática do material lignocelulósico. Adaptado de Xie <i>et al.</i> , (2007) e Lakhundi <i>et al.</i> , (2015). 28	
Figura 7. Rotas metabólicas e produtos da bioconversão de glicose e xilose durante a fermentação por bactérias. Traduzido de Guragain and Vadlani (2017).....	35
Figura 8. Fluxograma experimental para melhor entendimento dos procedimentos realizados.....	41
Figura 9. Frasco âmbar utilizado como reator nos ensaios de fermentação (250 mL)..	42
Figura 10. Colônias obtidas a partir dos bagaços A, B e C após 96 h de fermentação. 53	
Figura 11. Resultado da coloração de Gram dos isolados A3 e B1 onde podem ser vistas células vegetativas e em processo de esporulação visualizadas por microscópio óptico (1.000 \times).	55
Figura 12. Microscopia óptica (1000 \times) referente aos isolados A2 e B2.....	56
Figura 13. Microscopia óptica (1000 \times) referentes ao isolado C1 e à cultura mista C2. 58	
Figura 14. Curva de crescimento das culturas isoladas durante a fermentação com glicose (5 g/L).	59
Figura 15. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir fermentação de glicose pelas culturas isoladas das amostras de BCA.....	60

Figura 16. Riqueza de gênero e espécie nos tempos 0 h, 96 h e 408 h de fermentação para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar A, B e C.....	63
Figura 17. Gráfico da abundância relativa (>1%) em nível de gênero da microbiota autóctone dos bagaços de cana-de-açúcar (A, B e C) nos tempos 0 h, 96 h e 408 h de fermentação.	65
Figura 18. Gráfico da abundância relativa (>1%) em nível de gênero da microbiota autóctone dos seis bagaços de cana-de-açúcar (A, B, C, D, E e F) com 96 h de fermentação.	67
Figura 19. Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) das espécies identificadas nos reatores durante a fermentação dos bagaços de cana-de-açúcar (A, B, C, D, E e F) nos tempos estipulados (0 h, 96 h e 408 h).....	71
Figura 20. Gráficos da caracterização da estrutura química dos bagaços de cana-de-açúcar no início e final do ensaio de fermentação. O símbolo (*) indica diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).....	74
Figura 21. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir da fração líquida das seis amostras de BCA no decorrer da fermentação.	78
Figura 22. Gráfico da abundância relativa em nível de gênero da microbiota autóctone dos bagaços D, E e F em ensaios bioaumentados pelos isolados X (Klebsiella), Y (Bacillus) e Z (Sporomusa) com 96 h de fermentação.	86
Figura 23. Gráficos da caracterização da estrutura química dos bagaços de cana-de-açúcar no início (0 h) e final (408 h) do ensaio de fermentação bioaumentado. O símbolo (*) indica diferença estatística entre o grupo indicado e o bagaço inicial ($p < 0,05$).....	90
Figura 24. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir da fração líquida das amostras de BCA (A, B, C, D, E e F) no decorrer da fermentação bioaumentada pelos isolados X (Klebsiella), Y (Bacillus) e Z (Sporomusa).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Traduzido de Wu <i>et al.</i> , (2022).	26
Tabela 2. Local de ação e produtos gerados por celulasas e hemicelulasas durante a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Houfani <i>et al.</i> , (2020) e Wu <i>et al.</i> , (2022).....	30
Tabela 3. Produtos gerados a partir da fermentação do bagaço de cana-de-açúcar por diferentes microrganismos.....	38
Tabela 4. Origem dos bagaços de cana-de-açúcar utilizados.	40
Tabela 5. Compostos presentes na curva padrão utilizada para quantificação dos compostos presentes nas amostras e seus tempos de retenção na coluna cromatográfica.	47
Tabela 6. Característica morfotintorial dos microrganismos isolados das amostras de BCA.....	54
Tabela 7. Resultado da identificação das cepas cultiváveis no tempo 96 h de fermentação.	58
Tabela 8. Riqueza de família, gênero e espécie presente nos BCA com 96 h de fermentação.	64
Tabela 9. Pré-tratamentos utilizados para remoção de lignina de biomassa lignocelulósica.....	75
Tabela 10. Concentração máxima dos metabólitos obtidos durante a fermentação do BCA.....	84
Tabela 11. Nomenclatura dos isolados destinados ao ensaio de fermentação bioaumentada.....	85
Tabela 12. Resultado dos ensaios bioaumentados X (<i>Klebsiella</i>), Y (<i>Bacillus</i>) e Z (<i>Sporomusa</i>) comparados com o controle quanto a remoção de lignina (Lig), celulose (Cel) e hemiceluloses (Hemi) nos bagaços D, E e F durante a fermentação.....	91
Tabela 13. Rendimentos máximos obtidos durante o processo de fermentação do BCA envolvendo todas as condições testadas.	99

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. HIPÓTESES.....	13
3. OBJETIVO.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. JUSTIFICATIVA.....	15
5. REVISÃO DE LITERATURA	17
5.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	17
5.1.1 Celulose.....	18
5.1.2 Hemiceluloses	19
5.1.3 Lignina	21
5.2 Biorrefinaria lignocelulósica.....	22
5.3 Pré-tratamento	24
5.4 Hidrólise enzimática.....	27
5.5 Microbiota autóctone do BCA	31
5.6 Fermentação da biomassa lignocelulósica	33
6. METODOLOGIA	40
6.1 Origem das amostras de bagaço de cana-de-açúcar	40
6.2 Fluxograma experimental.....	41
6.3 Ensaio de fermentação autóctone e monitoramento.....	42
6.4 Isolamento e identificação de bactérias provenientes da fermentação autóctone	43
6.5 Ensaios de fermentação com culturas isoladas.....	45
6.5.1 Fermentação utilizando glicose como substrato.....	45
6.5.2 Fermentação bioaugmentada do BCA (cultura isolada + microbiota autóctone).....	45
6.6 Análise dos metabólitos e açúcares da fração líquida dos ensaios de fermentação	46
6.7 Caracterização dos bagaços de cana-de-açúcar bruto e após os ensaios de fermentação autóctone e bioaugmentada	47
6.7.1 Teor de umidade.....	47
6.7.2 Teor de extrativos.....	48

6.7.3 Teor de lignina insolúvel e inorgânicos (cinzas).....	48
6.7.4 Teor de lignina solúvel.....	49
6.7.5 Teor de açúcares, ácidos e produtos de degradação.....	50
6.8 Identificação da microbiota autóctone do bagaço de cana-de-açúcar.....	51
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
7.1 Isolamento e identificação dos microrganismos cultiváveis.....	53
7.2 Ensaio de fermentação das culturas isoladas utilizando glicose como substrato.....	58
7.3 Caracterização metagenômica da microbiota autóctone do bagaço de cana-de-açúcar....	62
7.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.....	72
7.5 Metabólitos produzidos durante a fermentação do BCA.....	77
7.6 Fermentação bioaumentada do BCA (cultura isolada + microbiota autóctone).....	84
7.6.1 Caracterização metagenômica da microbiota do bagaço de cana-de-açúcar.....	85
7.6.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.....	89
7.6.3 Metabólitos produzidos durante a fermentação do BCA.....	94
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
9. CONCLUSÃO.....	102
10. PERSPECTIVAS.....	103
11. BIBLIOGRAFIA.....	104

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda global por energia e produtos químicos tem desencadeado pesquisas aprofundadas sobre alternativas sustentáveis para obtenção destes insumos (Jesus Junior *et al.*, 2022). Isto porque, o uso de combustíveis fósseis envolve diversos problemas como, por exemplo, a poluição ambiental, danos à saúde humana, finitude de suas reservas e elevado custo. Neste contexto, matérias-primas de origem biológica se tornam uma alternativa promissora para suprir esta demanda global de forma sustentável, diminuindo os impactos ambientais e a dependência por fontes de energia não renováveis (Guedes *et al.*, 2021).

A biomassa lignocelulósica se destaca como matéria-prima para obtenção de biocombustíveis principalmente em países com elevados índices de atividades agrícolas. Por ser um coproduto deste setor, o material lignocelulósico apresenta elevada disponibilidade a um preço razoável e é categorizado como uma fonte renovável rica em carbono (Rezania *et al.*, 2020). Desta maneira, a agroindústria sucroalcooleira nacional é evidenciada devido o Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo como principal subproduto o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) (Carlucci *et al.*, 2021). Esta biomassa lignocelulósica é constituída basicamente por celulose, hemiceluloses e lignina e é usualmente estocada e destinada à combustão para produção de energia elétrica e vapor, e mesmo após este uso ainda existe excesso de bagaço. Sendo assim, devido à sua rica composição, o BCA pode ser utilizado como matéria-prima para obtenção de biocombustíveis de segunda geração e outros bioprodutos de interesse industrial (Lima, 2018).

Para a conversão da biomassa em produtos de valor agregado, a indústria vem desenvolvendo instalações comumente chamadas de biorrefinarias. Deste modo, a biorrefinaria lignocelulósica é um processo integrado para produção de biocombustíveis, produtos químicos, energia e produtos de valor agregado por meio de diferentes métodos de conversão do material lignocelulósico, como termoquímico, bioquímico e crescimento de microrganismos (Banu *et al.*, 2021). A implementação destas unidades aproxima o mundo de atingir uma economia sustentável por meio da incorporação da bioeconomia circular, ou seja, por meio do uso de “resíduos” agrícolas, as biorrefinarias lignocelulósicas contribuem diretamente para que o ciclo de produção se feche e substitua a fase de fim de ciclo de vida da biomassa por sua conversão em produtos de interesse

industrial (Huang *et al.*, 2017). A Figura 1 mostra o conceito de bioeconomia circular na biorrefinaria lignocelulósica.

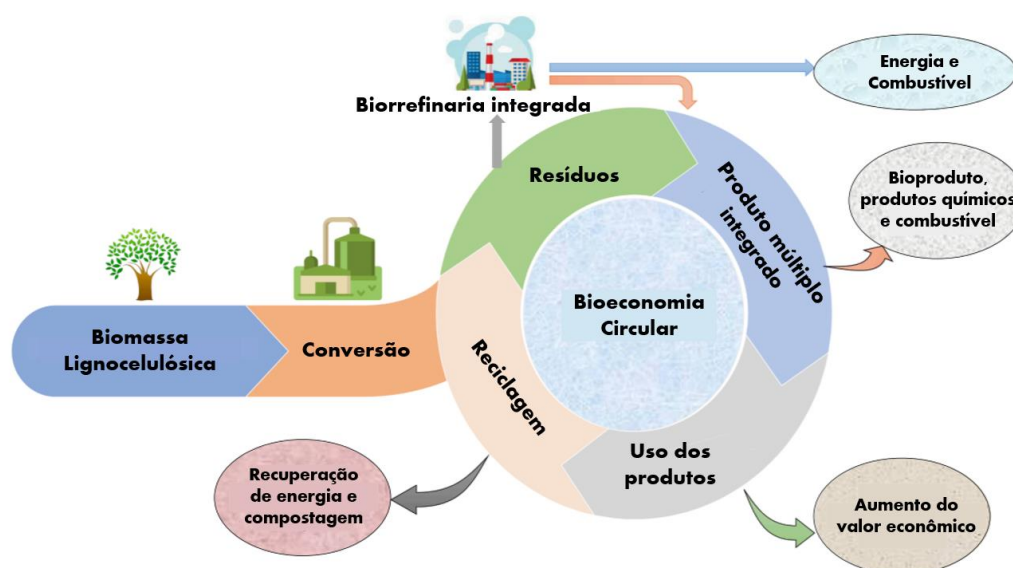


Figura 1. Conceito de bioeconomia circular na biorrefinaria lignocelulósica. Traduzido de Banu *et al.* (2021).

A bioeconomia circular envolve a ideia de maximizar o uso de recursos por meio da biorrefinaria lignocelulósica integrada, reduzindo os resíduos gerados e agregando valor aos produtos obtidos. Para que isso seja possível, o esquema de biorrefinaria em escala industrial deve ser projetado por meio de avaliações técnicas e econômicas para alcançar um método viável e que elucide seu potencial efeito socioeconômico (Clauser *et al.*, 2021).

Deste modo, os métodos de bioconversão da biomassa em produtos de valor agregado, têm a finalidade de romper e desestruturar a base recalcitrante do complexo lignocelulósico para que os açúcares fermentescíveis sejam disponibilizados, sendo necessárias quatro etapas operacionais principais: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação do produto (Guedes *et al.*, 2021). O pré-tratamento do material lignocelulósico pode ocorrer por meio de métodos físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos e, além de ser considerada a etapa mais cara de todo o processo, os métodos químicos e físico-químicos produzem inibidores que podem afetar a fermentação (Borges e Gigliolli, 2020). Desta forma, a fim de tornar a utilização do BCA mais favorável economicamente, alternativas como utilização de consórcios microbianos estão começando a ser investigadas para substituição das etapas usuais de conversão da biorrefinaria, utilizando por exemplo, bactérias do gênero *Clostridium*, para geração de

produtos químicos. Além da ruptura da estrutura polimérica da biomassa, microrganismos em sinergismo podem ser capazes de hidrolisar, fermentar os açúcares disponíveis e gerar bioprodutos de valor agregado, alcançando assim um bioprocesso consolidado, onde ocorrerão interações metabólicas entre bactérias consideradas promissoras neste contexto (Soares *et al.*, 2018; Menegatto, 2019).

Visando a obtenção de um consórcio microbiano eficiente na conversão do BCA, utilizar como inóculo a microbiota autóctone desta biomassa se torna uma estratégia promissora, uma vez que nele já foram identificados microrganismos com capacidade celulolítica e/ou de fermentação (Soares *et al.*, 2018; Menegatto, 2019). Desta maneira, fundamentado no propósito de agregar mais valor ao bagaço de cana-de-açúcar bruto, o presente estudo avaliou o potencial de auto-fermentação de seis amostras de BCA de origem distintas e caracterizou os produtos gerados e a microbiota presente. Além disso, realizou-se ensaios de bioaugmentação avaliando se a adição de bactérias enriquecidas favoreceria o processo fermentativo. A partir dos bioprocessos experimentados e analisados, foi obtida a produção dos ácidos capróico, acético, isobutírico, propiônico e succínico, além da produção de etanol e metanol. Com base na caracterização da estrutura química do BCA, houve uma significativa remoção de lignina, celulose e hemicelulose, principalmente em uma das condições de ensaio bioaugmentado.

2. HIPÓTESES

A) A microbiota autóctone presente no bagaço de cana-de-açúcar é uma rica fonte de bactérias que podem ser enriquecidas durante a fermentação da biomassa lignocelulósica, o que torna favorável o bioprocessamento consolidado do BCA.

B) Fatores como a espécie da cana-de-açúcar, região de cultivo, safra referente e armazenamento do BCA podem alterar a microbiota presente na biomassa lignocelulósica, influenciando diretamente nos produtos gerados durante sua fermentação.

C) A fermentação do BCA, potencializada pela adição de microrganismos isolados da sua microbiota autóctone, apresenta-se como uma alternativa favorável para a produção de bioprodutos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o processo de fermentação do bagaço de cana-de-açúcar bruto por microbiota autóctone e bioaugmentada, visando a obtenção de produtos de interesse comercial.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias da microbiota autóctone de BCA de diferentes origens em meio altamente seletivo;
- Comparar o processo fermentativo do BCA de origens distintas quanto à composição da microbiota autóctone, uso do substrato e geração dos bioprodutos;
- Avaliar o desempenho do processo fermentativo do BCA em ensaios bioaugmentados quanto à composição da microbiota, uso do substrato e geração dos bioprodutos.

4. JUSTIFICATIVA

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo como estimativa para a safra de 2023/2024 o total de 724 milhões de toneladas colhidas (CONAB, 2023). Desta produção, a quantidade de bagaço gerado é de aproximadamente 280 quilos, contendo 50% de umidade, para cada tonelada de cana processada, sendo o setor sucroenergético responsável por 77% da biomassa gerada no país (Setter *et al.*, 2020; Silva e Lima, 2020). Para geração de energia, cerca de 65% a 75% do BCA é destinado à combustão e o restante é estocado ou vendido por um baixo custo (CONAB, 2019).

Como exposto, o BCA é um material lignocelulósico composto por celulose (40-45%), hemiceluloses (20-24%) e lignina (25-30%) e por apresentar esta elevada quantidade percentual de carboidratos (60-69%) pode ser um promissor substrato para a biorrefinaria. Deste modo, as aplicações tecnológicas da biomassa lignocelulósica não se baseiam apenas na geração de energia, mas também na obtenção de produtos de interesse industrial que contribuem para agregar valor ao biomaterial e para que as refinarias de petróleo sejam substituídas pelas biorrefinarias em um futuro próximo (Ingle *et al.*, 2020).

Para que a o material lignocelulósico seja acessado e biotransformado pelos microrganismos, sua estrutura precisa ser desfeita e os polissacarídeos clivados em açúcares simples fermentescíveis. E para isso, a biomassa necessita passar por processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, os quais apresentam um elevado custo para a indústria (Nakaema, 2021). Além disso, durante a fermentação tradicional por leveduras, pode ocorrer contaminação por microrganismos que afetam o rendimento final do produto de interesse, sendo comum o uso de antibióticos para controlar a propagação microbiana indesejável (Oliveira, 2021). Por estes motivos, pesquisadores têm investigado cada vez mais o bioprocesso consolidado, o qual além de melhorar o rendimento e a produtividade do produto pode também reduzir os custos de equipamentos e operação, apresentando menor gasto, abundância e renovabilidade (Lu *et al.*, 2021). Além disso, os pré-tratamentos biológicos levam a um menor consumo de energia, são ecologicamente mais corretos e são mais adequados à posterior digestão anaeróbia, uma vez que não geram subprodutos tóxicos, como furanos, aos microrganismos durante o pré-tratamento (Nakaema, 2021).

Objetivando otimizar o bioprocesso consolidado, a busca por microrganismos que, em sinergismo, são capazes de realizar esta função com excelência é imprescindível. Segundo Dam (2021), diversas pesquisas têm investigado o microbioma do BCA e

relatado que seu consórcio microbiano é complexo e apresenta promissora capacidade metabólica de degradar a biomassa, sendo comum nestes estudos a descoberta de novas espécies quando comparado com outros ambientes lignocelulósicos. Usualmente, o principal foco de projetos deste domínio é a busca por microrganismos celulolíticos e hemicelulolíticos, porém, também foi descrito no trabalho de Gebbie *et al.*, (2020) a degradação de lignina solúvel que pode estar relacionada com atividade microbiana autóctone do BCA. De acordo com seu armazenamento diferentes espécies podem ser encontradas no BCA, quando organizado em pilhas, por exemplo, dependendo da camada analisada pode-se obter microrganismos com características específicas do local, como tolerância a elevada temperatura, baixo pH e baixos níveis de oxigênio. Desta forma, este é um ambiente propício e promissor para encontrar e/ou descobrir microrganismos biotecnológicos e enzimas produzidas por eles (Dam, 2021).

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

Após o processo de utilização da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é gerado o bagaço de cana, o qual é considerado uma biomassa vegetal altamente oxigenada, composto majoritariamente por carbono e oxigênio. Deste modo, em sua forma elementar, o biomaterial é constituído por oxigênio ($48,7 \pm 1,5\%$), carbono ($44,9 \pm 1,1\%$), hidrogênio ($6,1 \pm 0,8\%$), nitrogênio ($0,3 \pm 0,1\%$) e cinzas ($2,8 \pm 1,2\%$). Tais elementos constituem os três componentes principais (celulose, hemiceluloses e lignina) de estruturação da matriz lignocelulósica e esses componentes formam diversas interações intermoleculares entre si que os mantêm coesos e imersos dentro da matriz lignocelulósica, como demonstrado na Figura 2 (Rocha *et al.*, 2015; Lima, 2018).

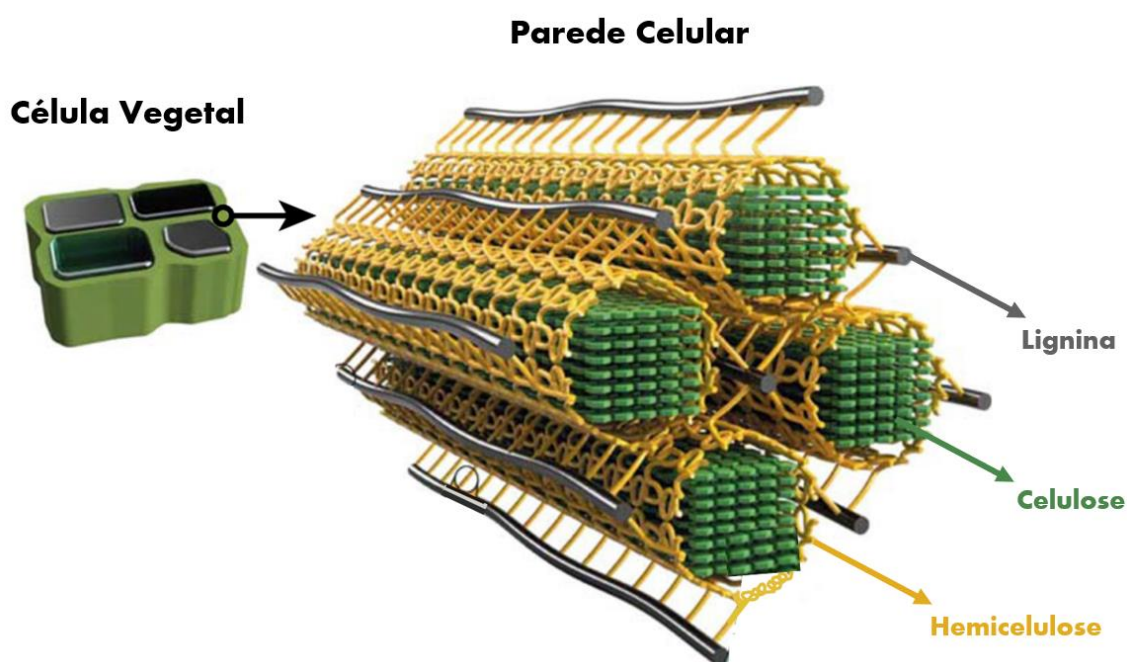


Figura 2. Estrutura e composição da parede celular do bagaço de cana-de-açúcar. Adaptado de Brethauer *et al.*, (2020).

Outros componentes também estão presentes no BCA, porém em menor proporção, como cinzas (compostos inorgânicos) e extrativos (compostos orgânicos que

consistem em gorduras, lipídeos, resinas, esteroides, flavonoides, taninos, terpenos e compostos fenólicos) (Okolie *et al.*, 2020). Juntas a celulose e as hemiceluloses formam a fração chamada de holocelulose. As hemiceluloses são macromoléculas de interface e de compatibilização entre a celulose e a lignina, sendo que as hemiceluloses estão ligadas quimicamente à lignina por meio de ligações químicas conhecidas como complexo carboidrato-lignina, as quais envolvem ligações de hidrogênio e ligações covalentes (tipicamente ésteres), constituindo assim uma estrutura altamente resistente à despolimerização (Ingle *et al.*, 2020).

Para que o BCA seja convertido em produtos de valor agregado, a metodologia utilizada precisa ser altamente conhecida e isto inclui a caracterização da estrutura do biomaterial. Para melhor entendimento, as próximas seções apresentarão as características e propriedades físico-químicas dos principais componentes do BCA.

5.1.1 Celulose

Considerada o recurso orgânico renovável mais abundante no mundo, a celulose é amplamente distribuída em plantas terrestres, bactérias e algas marinhas. É formada por um polímero de glicose, no qual as unidades de glicose estão unidas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 3). As cadeias de celulose são mantidas em uma forma coesa por meio de ligações de hidrogênio (intra e intermoleculares) e forças de van der Waals. A celulose é representada pela fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ onde “n” indica o número de unidades de β -D-anidroglicopiranoose presentes na molécula. A celulose é um polissacarídeo longo formado por cerca de 1.000 a 15.000 moléculas de glicose e, por ser um polímero fibroso, é ela quem confere base estrutural, flexibilidade e resistência à biomassa (Okolie *et al.*, 2020).

Durante a biossíntese da celulose, as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares são responsáveis pela ordenação e produção de fibrilas elementares, as quais são organizadas em grandes unidades conhecidas como microfibrilas. As ligações de hidrogênio intramoleculares são responsáveis por manter as cadeias de celulose lineares, enquanto as ligações de hidrogênio intermoleculares são responsáveis pela estrutura cristalina, conferindo à celulose uma estrutura altamente resistente e ordenada. Em outras palavras, as microfibrilas são várias cadeias de celulose organizadas e unidas por ligações de hidrogênio, sendo que em algumas regiões estas cadeias se encontram

altamente ordenadas (cristalinas) ou menos ordenadas (amorfas ou de grau de cristalinidade inferior) (Habibi *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2011).

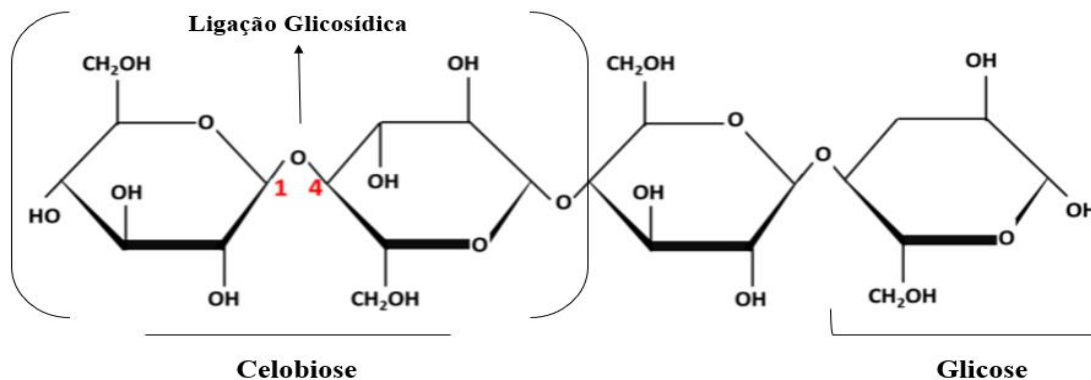


Figura 3. Polímero de celulose formado por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β-1,4, com a unidade repetitiva celobiose em evidência. Adaptado de (Okolie *et al.*, 2020).

Deste modo, além da presença de lignina, a elevada ordenação das microfibrilas e o elevado grau de polimerização da celulose impedem que esta seja dissolvida por solventes comuns, sendo este um dos obstáculos para acesso e disponibilização da glicose em métodos de conversão do BCA em produtos de interesse industrial, fazendo assim necessárias etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática (Chen, 2014).

5.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são macromoléculas que constituem a biomassa lignocelulósica e são formadas por diferentes açúcares, sendo eles açúcares de cinco carbonos (pentoses), como por exemplo xilose e arabinose, por açúcares de seis carbonos (hexoses) que podem ser glicose, manose, galactose e por ácidos de açúcar, como os ácidos glicurônico e galacturônico (Figura 4). Diferentemente da celulose, as hemiceluloses apresentam menor grau de polimerização e a sua estrutura amorfa que normalmente é composta por 200 a 600 monômeros de açúcares, sendo classificada como uma cadeia relativamente curta e altamente ramificada (Ingle *et al.*, 2020; Okolie *et al.*, 2020).

À vista disso, as hemiceluloses servem como um elo de ligação entre a celulose (ligações de hidrogênio) e lignina (ligações covalentes), fortalecendo a ligação entre os três componentes e conferindo ao material lignocelulósico maior estabilidade e

flexibilidade (Al-Battashi *et al.*, 2019). O principal polissacarídeo encontrado nas hemiceluloses de gramíneas como a cana-de-açúcar é a xilana, formadora da cadeia principal que é constituída de unidades de β -D-anidroxilopirranose, as quais são ligadas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -1,4. A partir das ramificações e ligações feitas entre açúcares, outros compostos são comumente encontrados em sua estrutura, como xiloglicanas, glicuroarabinoxilanas (GAXs) e mananas (Okolie *et al.*, 2020).

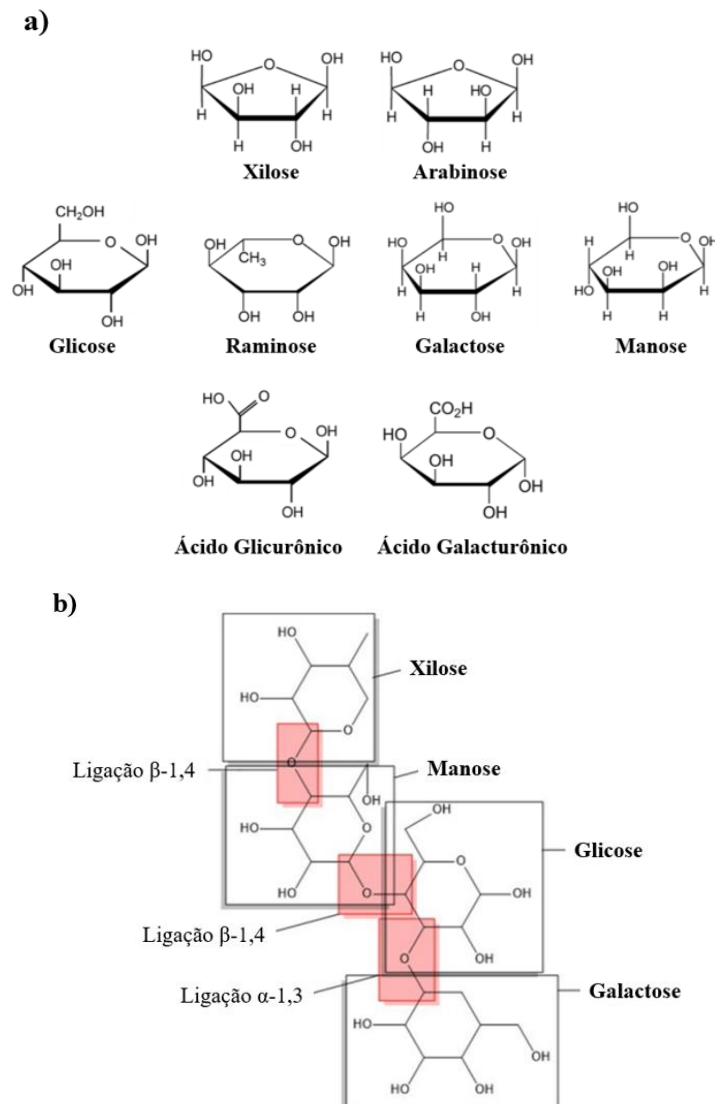


Figura 4. Estrutura química das hemiceluloses: (a) diferentes açúcares e ácidos de açúcares de hemiceluloses e (b) possível forma de ligação entre xilose- β (1,4), manose- β (1,4), glicose- β (1,4) e galactose- α (1,3) formando um fragmento de estrutura das hemiceluloses. Traduzido de Okolie *et al.*, (2020) e Senatore *et al.*, (2021).

5.1.3 Lignina

O material lignocelulósico é uma estrutura rígida e resistente por consequência da presença de lignina em sua composição. Unidades monoméricas de fenilpropano ligadas aleatoriamente por ligações éter e carbono-carbono formam a lignina e os três principais fenilpropanos encontrados são: álcool *p*-cumarílico (álcool 4-hidroxicinâmico), álcool coniferílico (álcool 3-metoxi-4-hidroxicinâmico) e álcool sinapílico (álcool 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico). Estas unidades básicas são unidas por ligações C–C e C–O–C dando origem à macromolécula de lignina (Okolie *et al.*, 2020). As unidades estruturais básicas dos três monômeros de lignina são ilustradas na Figura 5.

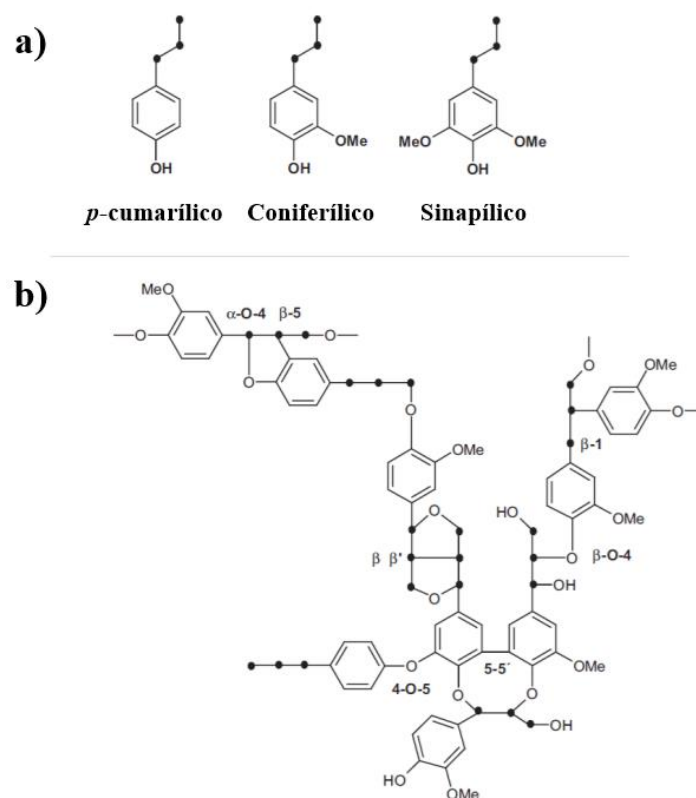


Figura 5. Estrutura química da lignina: (a) álcoois que formam as unidades estruturais básicas da lignina, (b) modelo de ligações entre monômeros de fenilpropano formando a lignina (Me = CH₃). Traduzido de Wegelius (2018).

A estrutura da lignina, por sua vez, forma uma rede tridimensional complexa, irregular e quase impermeável. Suas moléculas estão fortemente associadas às hemiceluloses por meio de interações intermoleculares e ligações covalentes e esta

configuração torna a biomassa resistente ao ataque microbiano (Senatore *et al.*, 2021). Desta maneira, é necessário que a lignina seja removida do material lignocelulósico quando o objetivo é a bioconversão dos açúcares existentes. Para isso, algumas alternativas podem ser aplicadas como, por exemplo, o uso de soluções alcalinas e ácidas, solventes orgânicos, meios oxidativos e líquidos iônicos (Okolie *et al.*, 2020).

Deste modo, após apresentar a estrutura do BCA, as próximas seções abordarão o conceito de biorrefinaria lignocelulósica para produção de etanol e outros bioprodutos, envolvendo os métodos tradicionais de pré-tratamento e hidrólise enzimática necessários para ruptura do BCA.

5.2 Biorrefinaria lignocelulósica

Questões ecológicas têm sido progressivamente discutidas em todo o mundo quando se referem ao uso de energia, principalmente quando esta é de origem fóssil, visto a elevada emissão de CO₂ e agravamento do aquecimento global causada por estas fontes. Diante disso, a busca por energia renovável, assim como seu uso, tem se intensificado tornando-a uma alternativa importante para resolução de problemas ambientais (Gyamfi *et al.*, 2020). Nesta perspectiva energética, a biomassa vegetal é considerada a principal alternativa para a produção de biocombustíveis e apresenta elevado potencial para diversificar a matriz energética atual. Isto porque sua conversão gera biocombustíveis que podem substituir os combustíveis fósseis, apresenta tecnologias flexíveis de acordo com a fonte utilizada e é sustentável. Neste contexto, o agronegócio nacional contribui fortemente no fornecimento de matéria-prima à base de biomassa tornando seu uso promissor no país (Guedes *et al.*, 2021).

Segundo a Agência Internacional de Energia (AIE) (2021), a geração de bioenergia global em 2020 aumentou 8% em relação ao ano anterior, mostrando que os índices resistiram bem à pandemia de Covid-19 mantendo o fornecimento de biomassa para geração de energia durante este período. A AIE enfatiza também que dentre as fontes renováveis, embora a biomassa seja menos competitiva do que energia eólica e solar em termos de custos, ela traz outras vantagens, as quais políticas nacionais de implantação de energia renovável poderiam capitalizar. No Brasil, em 2020, a participação da energia renovável foi marcada pelo aumento da oferta da biomassa de cana-de-açúcar, sendo responsável por 19,1% da oferta interna de energia nacional (EPE, 2021).

A biomassa lignocelulósica é uma fonte de carbono abundante no planeta e seu potencial de conversão ainda não é completamente explorado industrialmente. Contudo, novas técnicas de produção para aproveitamento deste biomaterial vêm sendo desenvolvidas devido à crescente demanda de combustíveis e produtos químicos renováveis (Senatore *et al.*, 2021). Esta conversão da matéria-prima ocorre nas biorrefinarias, onde é realizada a integração dos processos de fracionamento da lignina, celulose e hemiceluloses, tendo como objetivo o aprimoramento dos processos atuais para alcançar uma bioeconomia sustentável e capaz de substituir os produtos de origem fóssil (Banu *et al.*, 2021).

Para a conversão da biomassa em produtos de valor agregado, a indústria vem desenvolvendo instalações integradas comumente chamadas de biorrefinarias, as quais otimizam e aplicam técnicas de produção visando o total aproveitamento do BCA, tendo como principal objetivo operar numa conjuntura sustentável e agregar maiores rendimentos econômicos ao biomaterial (Ingle *et al.*, 2020). Assim, os métodos de bioconversão visam lisar e desorganizar a estrutura resistente do complexo lignocelulósico, a fim de liberar os açúcares fermentescíveis. Esse processo envolve quatro etapas operacionais principais: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação do produto. (Guedes *et al.*, 2021).

O material lignocelulósico pode ser oriundo de diferentes fontes e categorizado em 5 classes principais, sendo: (1) subprodutos e resíduos agrícolas (palhas e bagaços), (2) subprodutos florestais e resíduos de madeira (ramos, raízes e cascas), (3) resíduos da indústria de madeira (serragem e resíduos de madeira), (4) subprodutos da indústria de papel e celulose e de sementes oleaginosas e (5) materiais lignocelulósicos à base de gado (principalmente esterco) (Nakaema, 2021). E um exemplo de biomassa lignocelulósica promissora e bastante abundante no Brasil e no mundo é o bagaço de cana-de-açúcar (BCA). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com mais de 400 usinas sucroalcooleiras cadastradas no Departamento da Cana-de-Açúcar e Agroenergia, e aproximadamente 30% da produção de cana é gerada em bagaço após a moagem (CONAB, 2023; Silva e Lima, 2020).

Desta maneira, o excedente de BCA pode ser destinado principalmente para produção de etanol de segunda geração (2G), tendo potencial de produção de até 158 litros de etanol para cada tonelada de BCA (Carpio e Souza, 2017). Porém, com a otimização das técnicas de integração de usinas de etanol de primeira e segunda geração o compartilhamento de energia e material do mesmo local de operação se torna possível,

favorecendo o processo de produção. Além disso, resultados mais promissores já foram registrados quando utiliza-se operações importantes como modificação genética dos microrganismos fermentadores, técnicas eficientes de pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa, reciclagem celular, dentre outras (Dionísio *et al.*, 2021).

No trabalho de Dionísio e colaboradores (2021), por exemplo, a fermentação de açúcares com 5 e 6 carbonos foi feita separadamente e técnicas específicas de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram aplicadas a fim de otimizar a produção de etanol 2G por *Saccharomyces cerevisiae*. Os pesquisadores chegaram a uma produção final de 243,3 litros de etanol para cada tonelada de BCA. Além do etanol, outros compostos de interesse comercial podem ser obtidos por meio da conversão microbiana do BCA, como por exemplo, ácido succínico, ácido butírico, ácido acético, ácido propiônico, hidrogênio, dentre outros (Rabelo *et al.*, 2018).

No estudo de Tondro e colaboradores (2020) foi utilizada para fermentação do BCA uma co-cultura de *Enterobacter aerogenes* e *Clostridium acetobutylicum* e obtido, a partir de 1 kg de BCA, 136,2 L de hidrogênio e 115 g de acetona-butanol-etanol (ABE). Outro exemplo de utilização do BCA foi demonstrado por Jokodola e colaboradores (2022), os quais fizeram uso do bagaço e caroço de azeitona como substrato. Neste trabalho, a fermentação realizada por *Actinobacillus succinogenes* apresentou rendimento de 28-34 g/L de ácido succínico. Em ambos os trabalhos foram realizadas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, isto para que ocorra total aproveitamento dos açúcares presentes na estrutura recalcitrante do BCA. Os processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática serão evidenciados nas seções 5.3 e 5.4 para elucidação do tema.

5.3 Pré-tratamento

As principais etapas envolvidas na bioconversão do BCA são o fracionamento da biomassa por meio de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação do hidrolisado por microrganismos apropriados. Desta forma, o pré-tratamento faz parte das etapas iniciais e é indispensável para que a matriz lignocelulósica recalcitrante comece a ser explorada. Neste estágio busca-se a remoção da lignina, redução da fração cristalina da celulose e redução do grau de polimerização da estrutura da biomassa (Patel e Shah, 2021).

Um dos pontos críticos do pré-tratamento é o seu custo, sendo este o processamento mais oneroso das instalações de uma biorrefinaria. Desta forma, para que

seja compensatória, a técnica utilizada pela indústria deve abranger um fracionamento eficiente da biomassa e gerar compostos de elevado valor agregado em concentrações suficientes para tornar a purificação ou recuperação do produto economicamente viável (Bello *et al.*, 2018). Por este motivo, compreender qual metodologia adotar é fundamental para obtenção de lucro, de modo que diversas técnicas de pré-tratamento e seus respectivos rendimentos vêm sendo amplamente estudados (Clauser *et al.*, 2021).

Existem diversas alternativas de pré-tratamento que envolvem métodos (1) físicos: trituração mecânica, ultrassom, pirólise, (2) químicos: utilização de ácido diluído, peróxido de hidrogênio, líquido iônico, ozonólise, (3) físico-químicos: explosão a vapor, explosão de fibra com amônia (AFEX), água quente líquida, ou (4) biológico: uso de enzimas para deslignificação da biomassa ou uso dos microrganismos produtores destas enzimas (Al-Battashi *et al.*, 2019). Para a escolha do método, considerações sobre o mesmo devem ser analisadas, como a caracterização da composição química da biomassa, quantificação da perda de substrato, rendimentos de fermentação, geração de inibidores enzimáticos e de microrganismos contaminantes, degradação de açúcares, consumo de água e energia, recuperação dos produtos e segurança ambiental (Patel e Shah, 2021). Na Tabela 1 são apresentados alguns tipos de pré-tratamento e seus efeitos sobre a biomassa lignocelulósica.

Tabela 1. Métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Traduzido de Wu *et al.*, (2022).

Pré-tratamento	Principais efeitos na biomassa lignocelulósica	Observação	Referência
Pré-tratamento utilizando consórcio microbiano	Ataque à estrutura de lignina, celulose e hemicelulose. Deslignificação.	Custos efetivos, amplamente aplicados, condições amenas de pré-tratamento.	Boonyuen et al., 2014
Pré-tratamento térmico	Hidrolisa a hemicelulose, destrói a estrutura da lignina e celulose, aumentam a área superficial acessível.	Maior produção de precursores de substâncias húmicas prolongando o período de alta temperatura.	Huang et al., 2019
Pré-tratamento oxidativo	Ataca a estrutura de lignina recalcitrante e, em seguida, diminui a cristalinidade da celulose.	Ecologicamente correto, custos efetivos e condições amenas.	Wu et al., 2019
Pré-tratamento alcalino	Quebra as ligações de hidrogênio entre a celulose e hemicelulose, e as ligações de éster entre a lignina e hemicelulose.	Substância de desintoxicação eficaz.	Mustafa et al., 2018
Pré-tratamento ácido	Solubiliza parcial ou completamente a hemicelulose, reduz a cristalinidade da celulose, libera oligômeros e carboidratos.	Menos tóxico, corrosivo e perigoso.	Sheng et al., 2021
Pré-tratamento utilizando surfactante	Aumentam a acessibilidade das celulasas ao substrato.	Aumentam a hidrólise enzimática, evitam a ligação não produtiva do substrato às enzimas.	Cao e Aita, 2013

No pré-tratamento, a obtenção de um produto rico em celulose facilmente hidrolisável é crucial para que os processos posteriores de hidrólise enzimática e fermentação sejam efetivos, assim sendo, a geração de inibidores enzimáticos e/ou de microrganismos durante essa etapa é um grande problema para a bioconversão do BCA. Tais inibidores podem ser oriundos do pré-tratamento, como furanos (5-hidroximetil-2-furaldeído e 2-furfuraldeído), fragmentos de lignina condensados com furanos e ácido fórmico (produto de decomposição de furanos), ou aqueles endógenos da matéria-prima, como ácido acético e compostos fenólicos (Verardi *et al.*, 2020).

O pré-tratamento biológico se destaca por ser uma técnica que não produz inibidores, além de ser um método economicamente viável. A deslignificação efetiva da biomassa é realizada por enzimas lignolíticas (ex.: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase) produzidas pela ação sinérgica de fungos e bactérias, sendo necessário consórcios microbianos específicos. Apesar de ser um processo lento e exigir condições para o crescimento microbiano, o pré-tratamento biológico é ecologicamente correto, não faz uso de produtos químicos, não havendo necessidade de recuperação do mesmo e nem risco de liberação de compostos tóxicos no meio ambiente. Além disso, o

pré-tratamento biológico reduz o consumo de energia e a etapa de remoção da biomassa residual é simples (Boonyuen *et al.*, 2014; Sindhu *et al.*, 2015).

Os fungos de podridão branca (*Basidiomycota* e *Ascomycota*) são considerados os mais eficientes na degradação da biomassa lignocelulósica devido a sua capacidade de atacar seletivamente a lignina por meio da clivagem enzimática por ligninases e celulases (Rouches *et al.*, 2016). Além destes, bons resultados já foram registrados no pré-tratamento fúngico utilizando uma co-cultura de *Penicillia* e *Aspergilli*, sendo essa capaz de degradar 9,08% de celulose, 21,03% de hemiceluloses e 9,21% de lignina na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (Boonyuen *et al.*, 2014).

A utilização de bactérias em consórcios microbianos também apresentou resultados promissores em pré-tratamentos biológicos. A inoculação de actinomicetos termofílicos, como *Streptomyces sp.* e *Micromonospora sp.*, em um consórcio microbiano melhorou a utilização da matéria-prima lignocelulósica resultando na degradação final de 46,2% de celulose, 22,5% de hemiceluloses e 28,9% de lignina (Wu *et al.*, 2022). Outra alternativa que vem enaltecendo a utilização do pré-tratamento biológico é o seu uso combinado com técnicas de pré-tratamentos químicos ou físicos, por exemplo (Sindhu *et al.*, 2015).

Desta forma, a etapa de pré-tratamento é primordial para fracionamento e utilização efetiva da biomassa lignocelulósica e contribui diretamente com o sucesso da etapa de hidrólise enzimática. Assim sendo, a próxima seção abordará as características do processo de hidrólise enzimática e sua importância para a bioconversão do BCA.

5.4 Hidrólise enzimática

A partir do pré-tratamento do material lignocelulósico, as cadeias oligoméricas de celulose e hemiceluloses são hidrolisadas e têm seu grau de polimerização reduzido, facilitando a sua liberação para a fase líquida em uma posterior etapa de hidrólise enzimática. Além disso, há modificação dos poros da biomassa, facilitando assim o processo de hidrólise, o qual disponibiliza os açúcares fermentescíveis para posterior conversão biológica. Entre as estratégias de hidrólise, as não enzimáticas (métodos físicos e químicos) são processos complexos, inespecíficos e com baixos rendimentos. Desta maneira, a hidrólise enzimática é a abordagem mais eficaz, viável e ecologicamente correta para explorar os açúcares presentes na matéria-prima lignocelulósica (Chandel *et al.*, 2018).

Durante a hidrólise enzimática do BCA vários tipos de enzimas hidrolíticas são necessárias para clivar os diferentes tipos de ligações presentes na estrutura da biomassa. As principais celulases, enzimas que degradam a celulose, são endoglicanases (EnG), exoglicanases (ExG) e β -glicosidade (BG) (Verardi *et al.*, 2020), as quais têm sua ação representada na Figura 6.

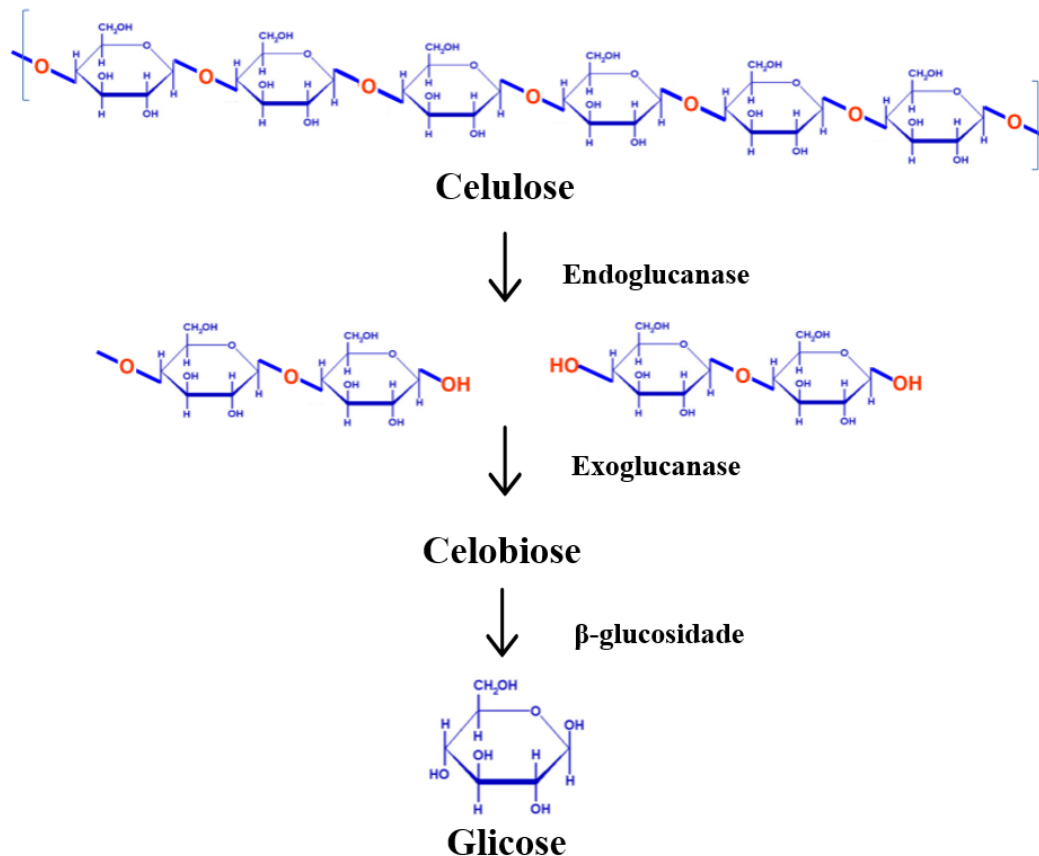


Figura 6. Enzimas envolvidas na degradação da celulose durante a hidrólise enzimática do material lignocelulósico. Adaptado de Xie *et al.*, (2007) e Lakhundi *et al.*, (2015).

As três enzimas essenciais atuam em sinergismo, sendo o papel das EnG clivar as ligações glicosídicas das regiões de menor grau de ordenação da celulose (regiões “amorfas”), produzindo oligossacarídeos e abrindo novas extremidades na cadeia. As ExG clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas nas unidades terminais das macromoléculas de celulose, disponibilizando celo-oligossacarídeos (ex.: celobiose, celotriose e celotretose). E as BG hidrolisam os oligossacarídeos gerados por EnG e ExG

em glicose, afetando diretamente o rendimento do processo de degradação da celulose (Liu *et al.*, 2021).

Estudos recentes revelaram que concomitantemente com as três principais enzimas citadas, algumas enzimas auxiliares atuam melhorando a eficiência da hidrólise da celulose, como por exemplo, mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) e celobiose desidrogenases (CDHs) (Barbosa *et al.*, 2020). As LPMOs são enzimas não hidrolíticas que resultam na clivagem de oligossacarídeos e polissacarídeos da cadeia de celulose hidrolisando ligações glicosídicas β -1,4 pela oxidação de um único átomo de oxigênio nas unidades de glicose. E as CDHs são proteínas extracelulares glicosiladas que atuam como doadoras de elétrons para LPMOs, realizando assim uma ação cooperativa essencial para que as LPMOs realizem reações redox para hidrólise da biomassa lignocelulósica (Patel e Shah, 2021; Wu *et al.*, 2022).

Conhecer detalhadamente o mecanismo de hidrólise enzimática é de suma importância para obtenção de bons resultados. A eficiência da sacarificação é diretamente afetada pela concentração de enzimas utilizada, temperatura, pH, concentração de fonte de carbono, eficiência de degradação, influência dos produtos gerados sobre os microrganismos, entre outros parâmetros (Soleimani e Siadat, 2016). Usualmente, técnicas realizadas com temperatura inferior a 50°C, além de apresentar maior probabilidade de contaminação, geram baixos rendimentos de açúcares e necessitam de elevada dosagem de enzimas. Por este motivo, celulasas termoestáveis são as mais estudadas e utilizadas em processos de hidrólise enzimática, sendo as mais promissoras as celulasas produzidas por bactérias dos gêneros: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Caldibacillus*, *Acidothermus*, *Caldocellum* e *Clostridium*, e por fungos pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Talaromyces* e *Thermoascus* (Verardi *et al.*, 2020).

Como exposto anteriormente, diferente da celulose, as hemiceluloses possuem uma estrutura mais complexa. Desta forma, para degradação e disponibilização dos açúcares presentes diversas enzimas precisam atuar. As hemicelulasas podem ser caracterizadas como enzimas de degradação da cadeia principal (xilanase, mananase, arabinase, β -xilosidase, β -manosidase) e enzimas de clivagem da cadeia lateral (esterases, α -L-arabinofuranosidase) (Patel e Shah, 2021). Todas estas enzimas atuam em sinergismo e suas funções podem ser complementares. A xilanase e mananase, por exemplo, podem romper ligações internas aleatoriamente e produzir oligossacarídeos. A enzima acetil-xilana esterase atua nas cadeias laterais eliminando o grupo acetil dos resíduos de xilose que impedem a ação da endoxilanase. Outra enzima importante para a

hidrólise de materiais lignocelulósicos é a feruloil esterase, a qual pode degradar a parede celular, catalisando o rompimento das ligações éster entre o polissacarídeo (hemiceluloses) e o ácido ferúlico (Liu *et al.*, 2021).

Tabela 2. Local de ação e produtos gerados por celulasas e hemicelulasas durante a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Houfani *et al.*, (2020) e Wu *et al.*, (2022)

ENZIMAS	LOCAL DE AÇÃO	PRODUTOS
CELULASES		
Endoglucanases	Região amorfa da celulose	Oligossacarídeos
Exoglucanases	Extremidades redutoras e não redutoras da celulose	Glicose ou celobiose
β -glucosidase	Celobiose	Gluconolactona e glicose
LPMO	C1 ou C4 de glicose	Ácido aldônico
HEMICELULASES		
Xilanases	Cadeia central de xilana	Xiloligômeros curtos
β -xilosidase	Xiloligômeros	Xilose
β -Mananases	β -1,4 manana	β -1,4-mano-oligômeros
β -manosidases	Oligômeros β -1,4 mananas	Manose
α -L-Arabinofuranosidases	Ligações glicosídicas entre substituições de arabinofuranosil e resíduos da cadeia principal de arabinoxilana	L-arabinose
α -D-Glucuronidases	Ligação α -1,2-glicosídica da cadeia lateral de ácido 4-O-metil-D-glucurônico de xilana	Ácido glucurônico
Acetil xilano esterases	Substituições de acetil	Ácido acético
Feruloil esterases	Ligação éster entre as substituições de arabinose e ácido ferúlico	Ácido ferúlico
α -galactosidases	Ramos de α -galactosil na espinha dorsal do manana	Galactose

Microrganismos podem produzir as hemicelulasas de diferentes maneiras. Fungos como *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.* são capazes de produzir uma extensa gama de hemicelulasas em um único processo. Bactérias aeróbias degradam as hemiceluloses em duas etapas, produzindo hemicelulasas e hidrolisando os polissacarídeos gerados. E bactérias anaeróbias possuem uma estrutura semelhante à um celossoma contendo hemicelulasas para hidrolisar as hemiceluloses (Wu *et al.*, 2022). As hemicelulasas fúngicas podem ser produzidas, por exemplo, por espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* e as hemicelulasas bacterianas podem ser produzidas por

espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Chainia*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Butyrivibrio*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Aeromonas*, *Cytophaga*, *Cellvibrio* e *Thermotoga* (Wang *et al.*, 2019).

No trabalho de Hamann e colaboradores (2021), os pesquisadores exploraram a capacidade de produção de celulosoma por *Clostridium thermocellum* e projetaram uma versão reduzida do complexo enzimático utilizando xilanase (XynA), denominado pelos autores como mini-xilanossomo de *C. thermocellum*. A quantidade de açúcares degradados pelo composto enzimático foi de 0,40 mg/mL para o BCA bruto e de 0,83 mg/mL para BCA pré-tratado após 72 h de hidrólise. Posteriormente, foi adicionado ao processo holocelulase fúngica de *Trichoderma harzianum* e a degradação dos açúcares aumentou em 30%, alcançando 2 mg/mL. Portanto, os resultados obtidos demonstram que a combinação de co-culturas ou consórcios microbianos contribuem para a bioconversão da biomassa lignocelulósica, assim como o pré-tratamento.

Neste contexto, seguindo as etapas de degradação do BCA, na próxima seção será discutido o potencial hidrolítico e fermentativo da microbiota autóctone do BCA, sendo este um consórcio de organismos com potencial para alcançar o bioprocesso consolidado onde as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação são realizadas em um único sistema.

5.5 Microbiota autóctone do BCA

Estudos comprovam que solos e resíduos de compostagem são fontes potenciais para isolamento de comunidades microbianas com características propícias para digestão da biomassa lignocelulósica. Nestes trabalhos, os consórcios microbiológicos são comumente utilizados como inóculo para obtenção de biocombustíveis (Kawagoshi *et al.*, 2005). Em virtude da diversidade bioquímica de microrganismos encontrados nestes locais, trata-se de um sistema altamente celulolítico, com grande potencial fermentativo e, conseqüentemente, bastante promissor para processos biotecnológicos em larga escala (Soares *et al.*, 2020).

A biomassa lignocelulósica, na perspectiva biológica, pode ser considerada um ecossistema onde fatores externos influenciam na presença de microrganismos. A temperatura, pH, salinidade e oxigenação são fatores que exercem uma pressão seletiva sobre a biodiversidade de organismos vivos presentes no biomaterial. Por este motivo, microrganismos autóctones podem predominar sobre outros por produzirem enzimas

capazes de degradar celulose, hemiceluloses e desfazer a estrutura recalcitrante do material lignocelulósico (Ventorino *et al.*, 2015). Desta maneira, a comunidade microbiana do BCA é um recurso promissor para descoberta de novos microrganismos e enzimas degradadoras da biomassa (Gebbie *et al.*, 2020).

Mhuantong e colaboradores (2015), com base na caracterização funcional das enzimas degradantes de material lignocelulósico, relataram que a microbiota autóctone do bagaço de cana produz diversas enzimas lignocelulolíticas, destacando principalmente as celulases. E, a partir da metagenômica do BCA identificaram maior prevalência de bactérias do filo Proteobacteria na biomassa. Também após analisar a comunidade autóctone do BCA, Mello e colaboradores (2016) identificaram a presença de microrganismos dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria que estão associados à degradação da biomassa. Assim como, os gêneros *Cellulomonas*, *Paenibacillus* e *Cellvibrio* também foram identificados.

Desta maneira, diversos estudos sobre o microbioma do BCA têm mostrado a diversidade e o quão promissoras são as espécies encontradas quando comparadas com outros ambientes lignocelulósicos. Tendo como destaque principalmente organismos com elevado potencial metabólico na decomposição do BCA (Dam, 2021). Na pesquisa de Gebbie *et al.*, (2020), a microbiota autóctone do BCA foi analisada em diferentes locais, tendo em vista que o bagaço é armazenado em pilhas, os pesquisadores retiraram amostra da biomassa em diferentes profundidades da pilha, ou seja, diferentes camadas. Cento e quatro microrganismos foram cultivados de diferentes camadas e 70% apresentaram enzimas com atividade carboximetilcelulase, 67% de xilanase, 70% de lacase e 57% de peroxidase. Tais porcentagens foram crescendo nas camadas mais profundas e 44% dos microrganismos nelas encontradas apresentaram as quatro atividades enzimáticas simultaneamente, concluindo, portanto, que o BCA foi um ambiente seletivo e valioso para identificação de microrganismos e enzimas com potencial biotecnológico.

Sabendo disto, utilizar a microbiota autóctone do BCA para degradar o material lignocelulósico é uma estratégia promissora para disponibilização dos açúcares presentes em sua estrutura. Neste contexto, Menegatto (2019) avaliou a fermentação do BCA utilizando como inóculo apenas sua microbiota autóctone em um bioprocesso consolidado, investigando assim, o potencial de bioconversão desta comunidade. O principal metabólito obtido foi o ácido acético (1,3 g/L) e, em um ensaio de fermentação bioaumentado, obteve-se 0,5 g/L de acetona e 0,3 g/L de ácido butírico.

O trabalho de Soares e colaboradores (2018) também testou a microbiota autóctone do BCA como inóculo para fermentar a própria biomassa, porém, com acréscimo de inóculo oriundo de um lodo termofílico. Ao final da fermentação, obteve-se principalmente hidrogênio, metano e ácidos orgânicos como bioprodutos. A microbiota identificada no BCA bruto constituiu principalmente dos gêneros *Streptomyces* (20,32%), *Paenibacillus* (10,64%), *Stenotrophomonas* (8,27%), *Sphingomonas* (7,01%), *Luteibacter* (4,06%), *Enterobacter* (2,89%), *Agrobacterium* (2,62%), *Novosphingobium* (1,38%), *Cohnella* (1,28%), *Chryseobacterium* (1,26%) e *Pseudomonas* (1,24%).

Com base no conhecimento dos microrganismos envolvidos na fermentação do BCA, a próxima seção abordará o processo fermentativo do BCA por microrganismos produtores de etanol e outros produtos de valor comercial.

5.6 Fermentação da biomassa lignocelulósica

O BCA tem sido utilizado para geração de diversos produtos por meio de processos distintos, como por exemplo, para produção de eletricidade, biogás, enzimas, ração para bovinos, biorremediação de metais tóxicos em águas residuárias, dentre outros. Porém, o foco principal das indústrias e pesquisadores está relacionado com a fermentação do BCA para produção de biocombustíveis e ácidos orgânicos (Alokika *et al.*, 2021).

Na biorrefinaria, o processo de fermentação é realizado por microrganismos capazes de converter os açúcares da biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado. Tais produtos podem ser obtidos por meio de diferentes configurações de processo, como SHF (Hidrólise e Fermentação Separadas), SSF (Sacarificação e Fermentação Simultâneas), SSCF (Sacarificação e Cofermentação Simultâneas) e CBP (Bioprocesso Consolidado) (Morales-Martínez *et al.*, 2017). Para alcançar bons rendimentos de fermentação, é necessário selecionar microrganismos capazes de metabolizar todos os açúcares da biomassa lignocelulósica em bioprodutos de interesse (Chandel *et al.*, 2018).

Para que aconteça a ruptura da estrutura recalcitrante e o BCA seja utilizado como fonte de carbono durante a fermentação, é necessário um consórcio microbiano composto por bactérias celulolíticas, acidogênicas e acetogênicas para alcançar uma bioconversão com bons rendimentos. A hidrólise da biomassa lignocelulósica é comumente realizada por bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*,

Ruminococcus, *Bacteriodes*, *Acetovibrio* e *Microbispora*. A acidogênese, envolve bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Escherichia*, enquanto a acetogênese está associada aos gêneros *Acetobacterium*, *Syntrophomonas*, *Clostridium*, *Sporomusa*, *Syntrophospora*, *Thermosyntropha* e *Eubacterium* (Parsae et al., 2019).

Fungos também são utilizados para fermentar o BCA, principalmente quando o objetivo é a obtenção de etanol. Os melhores rendimentos do bioproduto estão relacionados com a tradicional fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, porém, somente os açúcares de seis carbonos (C6) são utilizados por essa levedura e, desta forma, os outros açúcares (C5) presentes na biomassa não são metabolizados (Bertuci, 2021). Pensando nisso, Xu e colaboradores (2021) utilizaram uma co-cultura da levedura *S. cerevisiae* com a bactéria *Actinobacillus succinogenes* objetivando a obtenção de etanol e ácido succínico a partir do BCA. Com a estratégia utilizada, incluindo pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática da biomassa, o rendimento alcançado foi de 22,0 g/L de etanol e 22,1 g/L de ácido succínico.

Os produtos de fermentação estão diretamente relacionados com as condições de aeração do processo e microrganismos utilizados. Caso refira-se a bactérias anaeróbias facultativas, como *Enterobacter aerogenes*, para otimizar a produção de produtos específicos de interesse, é fundamental garantir uma oferta de oxigênio limitada, porém não nula. Além disso, o controle adequado da aeração irá reduzir a formação de subprodutos, os quais podem ser inibitórios e dificultar a recuperação do produto desejado (Celińska e Grajek, 2009). A maioria dos microrganismos fermentadores realizam processos mistos de fermentação resultando na obtenção de diversos produtos, algumas possibilidades relacionadas a esse tipo de metabolismo estão representadas na Figura 7.

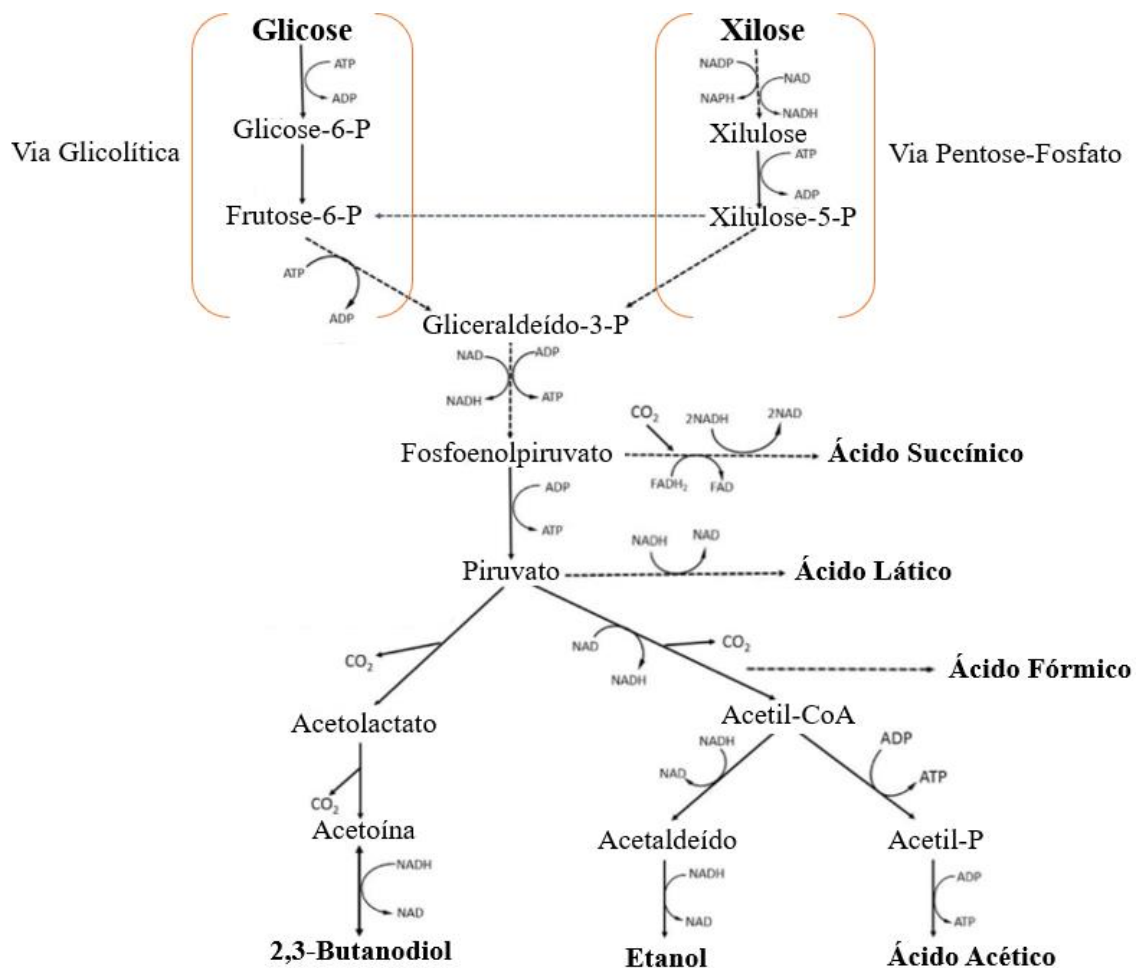


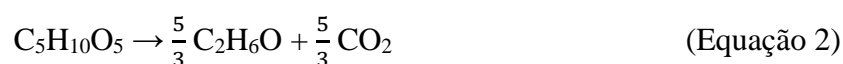
Figura 7. Rotas metabólicas e produtos da bioconversão de glicose e xilose durante a fermentação por bactérias. Traduzido de Guragain and Vadlani (2017).

Para geração de etanol e ácidos orgânicos, os monossacarídeos são convertidos por microrganismos acidogênicos e acetogênicos, e o piruvato ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$) é um elemento crucial neste processo por ser um composto intermediário no metabolismo dos carboidratos, isto é, ele pode ser convertido em diferentes produtos. Na fermentação da biomassa lignocelulósica, ácido acético, butírico e propiônico são comumente produzidos pela via acidogênica e esta pode ser classificada em tipo acetato-etanol, tipo butirato e tipo propionato (Zhou *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2021). Na etapa acetogênica os produtos da acidogênese são oxidados e convertidos em ácido acético por bactérias acetogênicas e outros produtos obtidos são hidrogênio e CO_2 (Soares *et al.*, 2019).

Além dos parâmetros citados, pH, temperatura e concentração de substrato também influenciam os rendimentos finais de fermentação e todas estas condições são determinadas de acordo com o metabolismo do microrganismo fermentador (Guragain e

Vadlani, 2017). Condições de pH alcalino, por exemplo, favorecem a formação de ácidos orgânicos e o pH ácido prejudica estes rendimentos. O pH ideal para cada fermentação depende, além do microrganismo, da concentração do substrato utilizado. Majoritariamente, ácidos orgânicos são formados em processos fermentativos acarretando em queda do pH no reator, simultaneamente, a concentração de substrato disponibilizada cessa gradualmente e estes fatores contribuem com a inativação da cultura presente. Com relação à temperatura, esta está intrinsecamente relacionada com a eficácia dos bioprocessos devido à influência significativa na atividade enzimática e estabilidade das células. Em termos gerais, a faixa de 30–40°C é a mais apropriada para a fermentação bacteriana. Quando a temperatura ultrapassa esse limite ideal, a degradação celular se torna mais proeminente do que o crescimento. Por outro lado, com temperatura abaixo do ideal, a regulação e a taxa de metabolismo podem cair (Grajek, 2009).

A produção do etanol de segunda geração (2G), assim como de outros produtos, começa a partir dos açúcares hidrolisados do BCA. A glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato por meio da via glicolítica e os açúcares de cinco carbonos (C5) pela via pentose-5-fosfato e finalmente convertidos em piruvato, por meio da via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). O piruvato é descarboxilado para obtenção do acetaldeído pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase e por fim convertido em etanol (Figura 7) (Devi *et al.*, 2021). A relação estequiométrica da produção de etanol a partir da glicose é de 2:1 (etanol : glicose) com formação de 2 mols de dióxido de carbono (Equação 1). E a partir da xilose, a relação estequiométrica é de 5/3:1 (etanol : xilose) (Equação 2) (Konde *et al.*, 2020).



Visando melhores rendimentos dos produtos obtidos durante a fermentação, diversas tecnologias de inovação vêm sendo estudadas, como por exemplo, engenharia do processo de produção, melhoramento de biocatalisadores, processamento a jusante, análises econômicas precisas e engenharia genética dos microrganismos (Chandel *et al.*, 2019). No trabalho de Sun e colaboradores (2021b) utilizou-se como estratégia para otimização do processo a construção de um consórcio microbiano com a levedura

Scheffersomyces stipitis selvagem e a bactéria *Zymomonas mobilis* modificada geneticamente. A partir das melhores condições estabelecidas obteve-se a produção de 33,05 g/L de etanol lignocelulósico, concluindo que os microrganismos em sinergismo atuam melhor do que isolados e a modificação genética realizada contribuiu ainda mais para a produção do bioproduto.

Tondro e colaboradores (2020) aprofundaram os estudos na utilização do BCA por *Enterobacter aerogenes* e *Clostridium acetobutylicum* para produção simultânea de hidrogênio e acetona-butanol-etanol (ABE). O resultado mais promissor foi de 136,3 mL de hidrogênio e 0,12 gramas de ABE por grama de BCA. Os experimentos foram realizados também com as bactérias isoladas e concluiu-se que a co-cultura contribuiu para melhores rendimentos. Assim sendo, para otimização dos processos de fermentação, é fundamental compreender o metabolismo dos microrganismos envolvidos. Na Tabela 3 é apresentada a fermentação do BCA por diferentes microrganismos e seus respectivos produtos gerados durante o processo.

Desta maneira, selecionar microrganismos promissores é um fator crucial dentro do processo de conversão do material lignocelulósico e nota-se que a obtenção de bioprodutos a partir do BCA vai além da produção de etanol, alcançando rendimentos consideráveis de compostos de interesse industrial. Deste modo, o presente estudo investigou o potencial do BCA bruto pode ser como substrato no processo de fermentação, devido sua estrutura rica em carboidratos, e como fonte de microrganismos com atividade lignocelulolítica e fermentativa, objetivando assim, alcançar um bioprocessos consolidado para obtenção de bioprodutos.

Tabela 3. Produtos gerados a partir da fermentação do bagaço de cana-de-açúcar por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Processo Utilizado	pH / Temperatura / Tempo de ensaio	Produto	Concentração (g/L)	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PT-AL + HE	5,2 / 37°C / 96 h	Etanol	75,57	Gao <i>et al.</i> , 2018
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PT-AC + HE	- / 35°C / 96 h	Etanol	56,1	Unrean <i>et al.</i> , 2018
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PT-AL + HE	- / 37-38°C / 72 h	Etanol	45	Zhao <i>et al.</i> , 2011
<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>	BPC	8,0 / 55°C / 144 h	Etanol / Ác. acético	1,95 / 1,5	Singh <i>et al.</i> , 2019
<i>Clostridium thermocellum</i>	BPC	7,0 / 60°C / 120 h	Etanol / Ác. acético	0,41 / 1,52	Liu <i>et al.</i> , 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i>	PT-AL + HE	6,0 / 28°C / 96 h	Ácido succínico	33,2	Ong <i>et al.</i> , 2019
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	PT-AC + HE	7,0 / 37°C / 24 h	Ácido succínico	22,5	Borges e Pereira, 2011
<i>Yarrowia lipolytica</i>	PT-HT + HE	4,0 / 30°C / 192 h	Ác. acético / Ác. succínico	25,0 / 22,3	Prabhu <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus sp.</i>	PT combinado + HE	5,5 / 50°C / 96 h	Ácido láctico	185	Peng <i>et al.</i> , 2014

Microrganismo	Processo Utilizado	pH / Temperatura / Tempo de ensaio	Produto	Concentração (g/L)	Referência
<i>Lactobacillus pentosus</i>	PT-AC + HE	6,5 / 35°C / 120 h	Ác. láctico / Ác acético	55,5 / 6,99	González <i>et al.</i> , 2019
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	PT-AC + HE	6,0 / 37°C / 380 h	Ác. butírico / Ác. acético	20,9 / 6	Wei <i>et al.</i> , 2013
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	PT-AC + HE	- / 37°C / 84 h	Acetona-Butanol-Etanol	5,5 - 9,1 - 0,8	Gomes <i>et al.</i> , 2019
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PT-AL + HE	7,0 / 37°C / 48 h	2,3-butanodiol	17,35	Song <i>et al.</i> , 2012
<i>Clostridium beijerinckii</i>	PT combinado	7,0 / 37°C / 96 h	Butanol / ABE	6,86 / 11,9	Su <i>et al.</i> , 2015
Autóctone do BCA e LT	BPC	6,0 / 55°C / 65 h	Ác. acético / Ác. isovalérico / Ác. valérico	0,11 / 0,02 / 0,02	Soares <i>et al.</i> , 2018
Autóctone do BCA e LT	PT-HT + PT-AL + BCA bruto	6,0 / 55°C / 65 h	Ác. acético / Ác. propiônico / Ác. butírico	0,19 / 0,53 / 0,16	Soares <i>et al.</i> , 2018

PT: Pré-tratamento; **AL:** Alcalino; **AC:** Ácido; **HT:** Hidrotérmico; **BPC:** Bioprocesso consolidado; **BCA:** Bagaço de cana-de-açúcar; **ABE:** Acetona-Butanol-Etanol; **LT:** Lodo termofílico; **HE:** Hidrólise Enzimática.

6. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM) e no Laboratório de Química Tecnológica Ambiental (LQTA), ambos na sede da Universidade Federal de Ouro Preto.

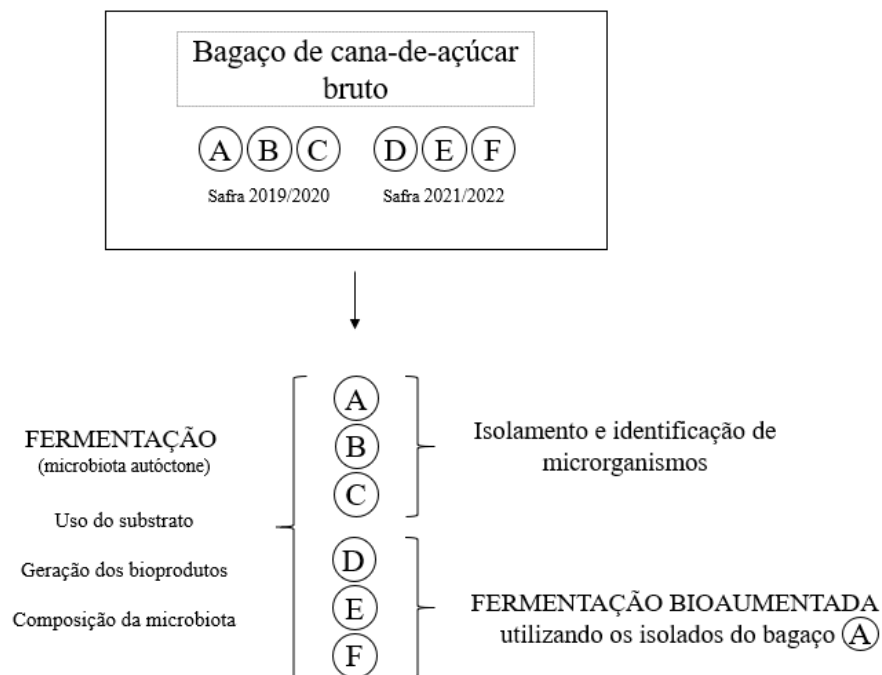
6.1 Origem das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

Seis amostras de BCA foram utilizadas no presente estudo com o intuito de comparar a microbiota autóctone, e avaliar o processo fermentativo em termos de consumo de substrato e produtos gerados. Essas foram cedidas após a moagem por usinas de etanol, mantidas em refrigeração (4°C) e denominadas como bagaço A, B, C, D, E e F como exposto na Tabela 4.

Tabela 4. Origem dos bagaços de cana-de-açúcar utilizados.

NOME	ORIGEM		SAFRA
	Usina	Cidade	
Bagaço A	Santo Ângelo	Pirajuba / MG	2019/2020
Bagaço B	Coruripe	Campo Florido / MG	2019/2020
Bagaço C	Bambuú Bioenergia	Bambuú / MG	2019/2020
Bagaço D	Santo Ângelo	Pirajuba / MG	2021/2022
Bagaço E	Coruripe	Iturama / MG	2021/2022
Bagaço F	Jatiboca	Urucânia / MG	2021/2022

6.2 Fluxograma experimental



FERMENTAÇÃO:

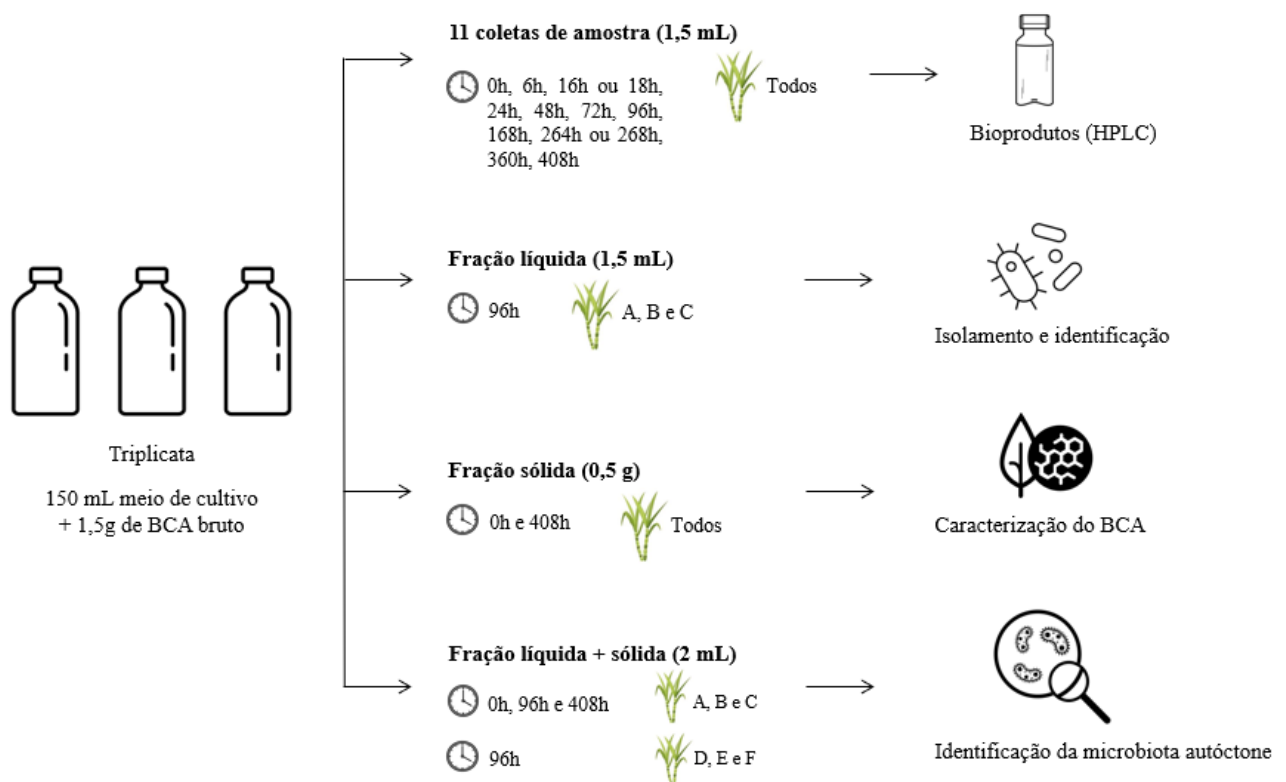


Figura 8. Fluxograma experimental para melhor entendimento dos procedimentos realizados.

6.3 Ensaio de fermentação autóctone e monitoramento

O ensaio de fermentação submersa do BCA bruto foi realizado em batelada, utilizando como reator um frasco âmbar de 250 mL de volume útil. Os testes foram realizados em triplicata e a concentração de BCA empregada foi de 10 g/L. O meio de fermentação utilizado, denominado água tamponada, adaptado de Silva (2017), foi composto por K_2HPO_4 (8,7092 g/L), KH_2PO_4 (6,8044 g/L) e extrato de levedura comercial (1 g/L). Este foi preparado com água destilada fervida, seu pH foi mensurado 7,18 (não ajustado) e esterilizado a 120°C por 20 min.



Figura 9. Frasco âmbar utilizado como reator nos ensaios de fermentação (250 mL).

Os frascos âmbar foram lavados com água fervente e secados em estufa a 70°C para dar início ao ensaio. Para 150 mL de meio foram adicionados 1,5 g de BCA bruto, totalizando 40% de *head space*. Para favorecer condições de anaerobiose, os frascos foram fechados com tampa de borracha, lacre de metal (Figura 9) e posteriormente purgados com nitrogênio por um minuto para remoção do oxigênio remanescente. Então, os reatores foram incubados a 37°C por 408 horas, sob agitação de 180 rpm em uma incubadora refrigerada com agitação orbital (Thoth®, modelo 6430B). Para análise dos metabólitos obtidos durante o ensaio, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL em 11 momentos da fermentação para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Seção 6.6).

Amostras dos experimentos também foram recolhidas para estudo da microbiota bacteriana. Para isolamento de bactérias fermentativas, alíquotas de 1,5 mL da fração líquida foram coletadas após 96 h de fermentação dos bagaços A, B e C, utilizando uma

seringa estéril e submetidas às técnicas de isolamento e cultivo, conforme descrito na seção 6.4. Estes microrganismos isolados foram submetidos à ensaios de fermentação utilizando glicose como substrato e também ensaios bioaumentados do BCA bruto com a finalidade de conhecer suas respectivas influências em tais situações (descritas na seção 6.5).

Já para a identificação da microbiota bacteriana total nos ensaios (metagenômica), 2 mL de amostra contendo as frações líquida e sólida, foram coletados exclusivamente de uma das triplicatas, abrindo os frascos nos tempos 0 h, 96 h e 408 h para os bagaços A, B e C e no tempo 96 h para os bagaços D, E e F, sob condições estéreis e posteriormente retornando a atmosfera anaeróbia. Essas amostras foram submetidas à identificação molecular por técnicas de sequenciamento de nova geração, conforme descrito na seção 6.8.

Por fim, as seis amostras de BCA utilizadas nos experimentos antes e após 408 h de fermentação foram submetidas à uma caracterização química, conforme descrito na seção 6.7.

6.4 Isolamento e identificação de bactérias provenientes da fermentação autóctone

A semeadura dos microrganismos foi realizada no tempo 96 h de fermentação com retirada de 1,5 mL do caldo fermentado, com o auxílio de uma seringa com agulha, dos reatores contendo os bagaços A, B e C. O material foi então espalhado em placas de Petri usando a técnica *Spread-Plate* e meio de cultivo ágar-nutriente acrescido de caldo fermentado em uma proporção 1:1. Para preparação do meio, um reator de cada BCA foi preparado com as mesmas condições de fermentação apresentadas na seção 6.2 e sacrificado para este fim no tempo determinado. O objetivo de adicionar caldo fermentado ao ágar nutriente foi manter a pressão seletiva (concentração de substratos e inibidores, pH, etc.) para isolamento de microrganismos adaptados. Assim sendo, o meio de cultivo finalizado foi autoclavado a 120°C por 20 min e vertido em placa.

Uma vez semeados, os inóculos foram incubados em jarra de anaerobiose, adaptado de Maiti *et al.* (2013) e Menegatto (2019), em estufa vertical (Biopar[®], modelo S80BA) a 37°C por 24 h. Após o crescimento dos microrganismos, estes foram novamente repicados e isolados utilizando apenas ágar nutriente como meio de cultivo. A fim de manter as cepas armazenadas para estudos posteriores, estas foram transferidas da placa de Petri para serem cultivadas em meio líquido anaeróbio comercial

(BacT/Alert[®]) e incubadas por 24 h, a 37°C e 180 rpm. Após cultivadas, 1 mL do inóculo foi transferido para um microtubo e congelado em glicerol a 500 g/L numa proporção 1:1.

Para caracterizar morfológicamente os isolados bacterianos cultiváveis, foi feita coloração de Gram seguido de visualização em microscópio óptico. Dessa forma, os isolados foram classificados quanto à estrutura da parede celular (Gram-positiva ou Gram-negativa) e morfologia (cocos, bacilos, vibriões, presença de esporos etc.). Posteriormente, culturas frescas dos isolados, crescidos em placa de Petri com ágar nutriente, foram submetidas à identificação por espectrometria de massas utilizando serviço terceirizado do Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Animais Aquáticos (Aquavet) da Universidade Federal de Minas Gerais. A tecnologia utilizada para identificação foi MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight mass spectrometry*): ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo, em outras palavras, é uma técnica que utiliza ionização para diagnosticar as proteínas de uma bactéria.

Os procedimentos foram realizados conforme a metodologia descrita em Assis *et al.* (2017). Para isso, uma única colônia de cada isolado foi transferida para uma placa alvo de aço e adicionado 1 µL de ácido fórmico (70%) e 1 µL de uma solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (conhecida como matriz MALDI-TOF) e o conteúdo foi mantido em temperatura ambiente até secar. Para adquirir os espectros, utilizou-se o espectrômetro de massa FlexControl MicroFlex LT (Bruker Daltonics[®]) com um laser de nitrogênio de 60 Hz, no qual até 240 disparos de laser são disparados em movimentos espirais para coletar 40 passos de disparo para cada ponto de tensão. As condições de detecção de faixa de massa foram determinadas para permitir a identificação de 1.960 e 20.134 m/z e para calibração foi utilizado o padrão de teste bacteriano (*Escherichia coli* DH5 alfa; Bruker Daltonics).

De acordo com o fabricante, os critérios de pontuação para identificação em tempo real (RT) são: pontuação entre 2.300 e 3.000 indica identificação em nível de espécie altamente provável, pontuação entre 2.000 e 2.299 indica identificação segura em nível de gênero e probabilidade de identificação de espécie, pontuação entre 1.700 e 1.999 indica a probabilidade da identificação do gênero e de 0 a 1.699 indica identificação não confiável. As comparações das cepas identificadas a partir do MALDI-TOF MS e de outras técnicas foram realizadas com o software R versão 3.0.1 (R Core Team, 2013) com as taxas de concordância determinadas pelo coeficiente Kappa.

6.5 Ensaios de fermentação com culturas isoladas

6.5.1 Fermentação utilizando glicose como substrato

Todos os microrganismos isolados dos bagaços A, B e C foram submetidos à fermentação com glicose a 5 g/L para análise do crescimento, consumo do substrato e obtenção de bioprodutos, com a finalidade de avaliar o comportamento destas cepas. Para preparo do pré-inóculo, uma colônia de cada isolado foi inserida em uma garrafa contendo 60 mL de meio de cultivo denominado água tamponada (descrito na seção 6.3) e incubado a 37°C por 24 h, sob agitação de 180 rpm, sob condições de anaerobiose. Dado o tempo de incubação, 1,2 mL do inóculo foi centrifugado em tubo estéril de 5 mL e adicionado aos reatores de fermentação (frasco âmbar contendo 150 mL de meio).

O ensaio de fermentação foi realizado em duplicata sob as mesmas condições do pré-inóculo. Para análise dos metabólitos produzidos e consumo de glicose foram retiradas alíquotas de 1,5 mL nos tempos 6, 12 e 24 h de cada reator para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Seção 6.5). A curva de crescimento durante o processo fermentativo foi obtida utilizando um espectrofotômetro UV-Vis a 530 nm e a absorbância foi analisada no pré-inóculo e nos tempos 0, 6, 12, 24, 36 e 48 h de fermentação.

6.5.2 Fermentação bioaumentada do BCA (cultura isolada + microbiota autóctone)

As três culturas isoladas do bagaço A (A1, A2 e A3) foram submetidas à fermentação da biomassa bruta (condições de ensaio iguais à seção 6.3) para avaliação da capacidade fermentativa e influência sob a microbiota autóctone do BCA. Os bagaços fermentados por estas cepas foram os D, E e F.

Para início do experimento, foi preparado o pré-inóculo com glicose a 5 g/L contendo 60 mL de meio de cultivo, incubado a 37°C por 24 h, sob agitação de 180 rpm. E para determinar a concentração de inóculo inicial a ser inserida nos reatores, trabalhos que visaram o bioprocessamento consolidado do BCA, usando culturas isoladas, foram utilizados como referência. Singh e colaboradores (2019), ao utilizar *Ruminiclostridium thermocellum* na fermentação do BCA estabeleceram uma concentração inicial de inóculo de 4% (v/v). Também objetivando o bioprocessamento consolidado, desta vez utilizando

Clostridium thermocellum, Liu e colaboradores (2020) utilizaram 5% (v/v) de inóculo no reator de fermentação. Desta forma, no presente estudo, foi adicionado 5% (v/v) de inóculo nos ensaios bioaumentados, isto é, 7,5 mL do inóculo foi centrifugado em tubo estéril de 15 mL, ressuspendido em 2 mL de meio de cultivo denominado água tamponada (descrito na seção 6.3) e adicionado aos reatores para dar início à fermentação.

O experimento foi feito em triplicata e todos os parâmetros analisados no ensaio de fermentação (descrito na seção 6.3) também foram avaliados para este, sendo eles: consumo de substrato, geração de bioprodutos e identificação da microbiota presente no reator.

6.6 Análise dos metabólitos e açúcares da fração líquida dos ensaios de fermentação

Para análise dos metabólitos detectados durante a fermentação autóctone e bioaumentada, foi coletado 1,5 mL de amostra de cada reator nos intervalos de tempo estipulados e filtrado em membrana de 0,22 µm para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detectores de arranjo de diodo e índice de refração (HPLC-DAD-RID) (Shimadzu®).

No sistema de cromatografia, utilizou-se duas colunas acopladas em série (HPX-87H e Fermentation Monitoring, Bio-Rad®) a uma temperatura de forno (TC 300 Controller, GBC) de 65°C e um auto injetor (SIL 20AC - Shimadzu®), programado para injetar 3 µL de amostra. A análise foi realizada usando detectores de arranjo de diodo (DAD) (SPD-M20A, Shimadzu®, selecionados os comprimentos de onda de 210 nm e 284 nm para a quantificação dos compostos) e pelo detector de índice de refração (RID-6A Shimadzu®). A fase móvel utilizada foi de ácido sulfúrico 6 mM (98%, LiChropur®), com vazão isocrática de 0,7 mL/min.

Como padrão para identificação e quantificação dos metabólitos foi utilizado um *pool* contendo alguns compostos que poderiam ser produzidos a partir da conversão do BCA por sua microbiota autóctone, com base em dados da literatura. Cada elemento presente no *pool* de padrões apresentou um pico em determinado tempo de retenção, demonstrados na Tabela 5, os quais foram comparados com os produtos obtidos. O padrão também foi preparado utilizando fase móvel de ácido sulfúrico 6 mM e as concentrações da curva padrão variaram de 0,04 g/L a 20 g/L para açúcares, 0,009 g/L a 5 g/L para ácidos e 0,119 g/L a 50 g/L para álcoois (com exceção do propanol que variou de 0,046 g/L a 23,3 g/L).

Tabela 5. Compostos presentes na curva padrão utilizada para quantificação dos compostos presentes nas amostras e seus tempos de retenção na coluna cromatográfica.

Detector de índice de refração (RID)	Tempo de retenção (min)	Detector de arranjo de diodo (DAD)	Tempo de retenção (min)
Celobiose	7,432	Ácido Succínico	15,042
Glicose	9,016	Ácido Láctico	16,147
Xilose	9,673	Ácido Fórmico	17,762
Arabinose	10,677	Ácido Acético	19,292
1,2-propanodiol	21,756	Ácido Propiônico	22,776
1,3-propanodiol	22,351	Ácido Isobutírico	25,666
Metanol	25,751	Ácido Isovalérico	27,875
Etanol	27,705	Ácido Valérico	38,924
Propanol	34,884	Ácido Capríco	46,228
Butanol	47,667		

6.7 Caracterização dos bagaços de cana-de-açúcar bruto e após os ensaios de fermentação autóctone e bioaumentada

A caracterização da biomassa lignocelulósica contemplou o bagaço bruto e o bagaço após o processo de fermentação com o intuito de analisar o teor dos componentes que o constituem em ambos os tempos, permitindo avaliar o impacto que a microbiota proporcionou ao biomaterial durante a fermentação autóctone e bioaumentada. As amostras de BCA foram secas em estufa a 60°C por 48 h e moídas em moinho Marconi®, modelo MA048, a fim de serem caracterizadas pelas metodologias descritas a seguir.

6.7.1 Teor de umidade

Para determinar o teor de umidade das amostras de BCA utilizou-se uma balança termogravimétrica OHAUS®, modelo MB25. Para análise, 0,5 g de biomassa foi colocado no equipamento o qual é aquecido a 105°C para que toda água presente na amostra evapore. O teor de umidade (%) é determinado ao alcançar uma massa estável, ou seja, quando ocorre o fim da evaporação da água. O cálculo desta porcentagem é realizado conforme a Equação 3.

$$U (\%) = \frac{m_{total} - m_{seca}}{m_{total}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Na qual: U é a umidade da amostra em porcentagem (%), m total é a massa total inicial utilizada na determinação (massa do bagaço mais umidade) (g) e m seca é a massa do bagaço seco no final da determinação (isenta de umidade) (g).

6.7.2 Teor de extrativos

Para quantificação do teor de extrativos utilizou-se a norma TAPPI T 204 cm-97 (*Solvent extractives of wood and pulp*) adaptada. Esta metodologia foi realizada apenas para as amostras de BCA bruto pois após 408 h de fermentação o teor de extrativos é considerado nulo. Desta forma, 10 g do BCA em base seca com granulometria inferior a 14 mesh foi colocada em um cartucho de papel filtro, o qual foi posicionado em um sistema Soxhlet composto por uma manta aquecedora Quimis[®], modelo Q321A25, um balão de fundo redondo com volume útil de 1000 mL, um extrator e um condensador de extrator Soxhlet médio (Uniglas[®]). Um volume de 125 mL de ciclohexano (99%) e 125 mL de etanol (95%) foram adicionados ao balão volumétrico com pérolas de vidro e o sistema foi montado. O processo de extração teve a duração de 48 h a partir do primeiro refluxo do extrator, sendo estes ajustados para ocorrer a cada 20-25 min. Após o término, o bagaço resultante foi lavado com 150 mL de água destilada sob um funil de Büchner em um sistema de filtração a vácuo. Posteriormente, o bagaço foi seco em estufa com circulação e renovação de ar SOLAB[®], modelo SL-102/100, a 60°C por 48 h e o teor de extrativos foi determinado a partir da diferença entre a massa, em base seca, inicial e final.

6.7.3 Teor de lignina insolúvel e inorgânicos (cinzas)

O teor de lignina insolúvel e inorgânicos foi quantificado conforme a norma TAPPI T 222 om-02 (*Acid-insoluble lignin in wood and pulp*) adaptada. Uma amostra de 0,2972 g de BCA em base seca foi adicionada a um tubo autoclavável de 350 mL com um bastão magnético de 15 mm. Com o auxílio de uma haste universal, os tubos foram colocados sobre um agitador magnético Fisatom[®], modelo 751. Foram adicionados 4 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) aos tubos que foram fechados e permaneceram sob agitação por 2 h. Após o término dessa primeira etapa, denominada de fase de condensação, 150 mL de água destilada foram adicionados aos tubos para que a solução de ácido sulfúrico fosse diluída a 3% (m/v). Feito isso, os tubos foram autoclavados por 1 h à 120°C em uma autoclave vertical PRISMATEC[®], modelo CS, pré-aquecida. Depois desse segundo

processo, chamado de fase de hidrólise, o conteúdo foi filtrado sob pressão reduzida em cadinho de vidro de placa porosa de 50 mL sobre um kitassato de 1 L. O líquido resultante da filtração é destinado para a determinação dos teores de lignina solúvel, teor de açúcares e produtos de degradação dos açúcares.

A fração sólida retida no cadinho após a filtração é referente ao teor lignina insolúvel e de inorgânicos (cinzas). Para isso, os cadinhos com a massa capturada foram secos em estufa a 80°C por 4 h. Assim, o teor de lignina insolúvel é quantificado a partir da diferença entre a massa do cadinho após secagem na estufa e a massa do cadinho mensurada previamente. Em seguida, o conteúdo retido no cadinho foi volatilizado com uma taxa de aquecimento de 2°C por min de temperatura ambiente até 550°C, permanecendo nesta por 2 h, em um forno mufla Magnu's®. Desse modo, o teor de cinzas é quantificado a partir da diferença entre a massa do cadinho após a volatilização da fração orgânica em mufla e a massa conhecida do cadinho de placa porosa.

6.7.4 Teor de lignina solúvel

A fração líquida obtida após a filtração (descrita na subseção anterior) foi transferida do kitassato para um balão volumétrico de 500 mL, o qual teve seu volume completado com água destilada. Um volume de 5 mL do líquido do balão foi retirado e o restante destinado para a quantificação do teor de carboidratos, ácidos e produtos de degradação (descrito na subseção seguinte). Desta maneira, a fração de 5 mL retirada foi diluída dez vezes e medida sua absorbância em um espectrofotômetro na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) Thermo Fisher Scientific®, modelo G10S UV-VIS, nos comprimentos de onda de 215 nm (A215) e 280 nm (A280). Assim sendo, o cálculo do teor de lignina solúvel foi dado de acordo com a Equação 4, adaptada de Goldschmid (1971).

$$\text{Lignina solúvel (\%)} = \left\{ \frac{\left[\frac{(4,53 A_{215}) - A_{280}}{300} \right] V}{m} \right\} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

em que: V é o volume da solução de ácido sulfúrico (L) e m é a massa da biomassa (g) em base seca.

6.7.5 Teor de açúcares, ácidos e produtos de degradação

O líquido contido no balão volumétrico (500 mL) na determinação do teor lignina solúvel (sessão anterior) foi filtrado em membrana de 0,22 μm e destinado para quantificação do teor de carboidratos, ácidos e produtos de degradação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando 1 mL do conteúdo. No cromatógrafo Shimadzu[®], utilizou-se uma coluna Aminex HPX 87H (300 \times 7,8 mm, Bio-Rad[®]), mantida à temperatura de 55°C e empregou-se como fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol/L a uma vazão isocrática de 0,6 mL/min. Os açúcares foram detectados por índice de refração e os ácidos e demais produtos de degradação (2-furfuraldeído e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído) por um detector UV-Vis, operado nos comprimentos de onda de 210 nm para os ácidos e 274 nm para os furanos. O padrão para quantificação das amostras foi obtido a partir dos compostos de elevada pureza para CLAE: celobiose ($\geq 98\%$), glicose ($\geq 99,5\%$), xilose ($\geq 99,5\%$), arabinose ($\geq 99,5\%$), ácido acético (49-51% em H₂O), ácido fórmico (49-51%), 5-hidroximetil-2-furfuraldeído ($\geq 98,0\%$), 2-furfuraldeído ($\geq 98,5\%$).

Dessa forma, os teores de celulose e hemiceluloses foram quantificados a partir da concentração dos compostos detectados por seus respectivos fatores de conversão acrescidos dos demais compostos que constituem o material, como descrito por Gurgel (2010) e representado nas Equações 4 e 5.

$$\text{Celulose (\%)} = \left[\frac{(0,95 C_{\text{celulose}} + 0,9 C_{\text{glicose}} + 3,52 C_{\text{ác fórmico}} + 1,29 C_{\text{HMF}}) V_{\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4}}{m_i} \right] \times 100$$

(Equação 5)

$$\text{Hemiceluloses (\%)} = \left[\frac{(0,88 C_{\text{xilose}} + 0,88 C_{\text{arabinose}} + 0,717 C_{\text{ác acético}} + 1,375 C_{\text{FF}}) V_{\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4}}{m_i} \right] \times 100$$

(Equação 6)

em que: HMF é a concentração de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído, FF é a concentração de 2-furfuraldeído e m_i é a massa inicial do BCA (em base seca).

Desse modo, posteriormente foi feito o cálculo do balanço de massa da composição do BCA que consiste na soma dos teores de celulose (C), hemiceluloses (H), lignina solúvel e insolúvel (L), cinzas (Z) e extrativos (E), conforme a Equação 6.

$$\text{Balanço de massa (\%)} = C + H + L + Z + E \quad (\text{Equação 7})$$

6.8 Identificação da microbiota autóctone do bagaço de cana-de-açúcar

Conforme mencionado anteriormente, para identificação da microbiota autóctone do BCA durante a fermentação, foram preparados reatores exclusivamente para este fim, com retirada de 2 mL de amostra nos tempos 0 h, 96 h e 408 h para os bagaços A, B e C e no tempo 96 h para os bagaços D, E e F. O conteúdo das amostras incluiu fração sólida e líquida do fermentado. Para o tempo de 0 h, o reator foi preparado seguindo as condições descritas na seção 6.3, incubado por 30 min a 37°C e 180 rpm e então retirada a amostra. Este procedimento para retirada de amostra do tempo 0 h foi realizado com o objetivo de dissociar a biomassa no meio de cultivo e aumentar a probabilidade de identificação dos microrganismos do BCA bruto na amostra.

As amostras coletadas nos três tempos de fermentação foram enviadas para a empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil) onde foram realizadas as reações de sequenciamento do DNAr 16S utilizando a tecnologia Illumina seguindo a metodologia descrita por Christoff *et al.* (2017). Para obtenção dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) duas estratégias foram aplicadas. Na primeira, utilizou-se os *primers* 341F e 806R, correspondentes à região V3-V4 que são referentes aos reinos Archaea e Bacteria, com a reação realizada em triplicata. Estes *primers* continham sequências Illumina com base no adaptador de estrutura TruSeq (Illumina, San Diego, CA), possibilitando que a segunda PCR obtivesse sequências de indexação. Em ambas as reações, foi utilizada a enzima Platinum Taq (Invitrogen, EUA). Para a primeira PCR utilizou-se como método: 95°C por 5 min (desnaturação); 25 ciclos de 95°C (45s), 55°C (30s) e 72°C (45s) para a etapa de hibridização; e 72°C por 2 min para a extensão final. Já na segunda PCR, utilizou-se: 95°C por 5 min para a etapa de desnaturação; 10 ciclos de 95°C (45s), 66°C (30s) e 72°C (45s) para recozimento; e extensão final a 72°C por 2 min.

Para serem adicionados à biblioteca de sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados (esferas AMPureXP - Beckman Coulter, Brea, CA). As bibliotecas agrupadas foram diluídas e quantificadas usando o KAPA Library Quantification Kit para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, Woburn, MA). Os produtos de PCR foram sequenciados em um sistema MiSeq, através dos *primers* padrão Illumina fornecidos no

kit específico e para leitura do sequenciamento padronizou-se o tamanho 283 pb (pares de base). Para garantir a qualidade da leitura foi utilizado um filtro convertendo cada pontuação de nucleotídeo em uma probabilidade de erro, levando em consideração o comprimento de leitura. Caso o resultado fosse menor ou igual a 0,01, a leitura era considerada na análise e leituras 100% iguais foram agrupadas para aumentar a confiabilidade do método. E os grupos representados por menos de 5 leituras não foram considerados nas análises posteriores.

As unidades taxonômicas operacionais (*Operational Taxonomic Units* – OTUs) foram submetidas à classificação taxonômica e comparadas à base de dados referente ao RNAr 16S (NeoRefdb, Neoprosecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brasil). Sequências que apresentaram semelhança maior que 99% com a base de dados de referência, foram taxonomicamente conferidas.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento dos resultados estes não serão apresentados na ordem cronológica em que as metodologias foram realizadas, e sim de maneira que a discussão discorra coerentemente com as informações obtidas ao longo do estudo e atenda a ordem dos objetivos traçados.

7.1 Isolamento e identificação dos microrganismos cultiváveis

Com o intuito de isolar bactérias presentes nos bagaços A, B e C, e tolerantes ao meio de fermentação, amostras foram retiradas dos reatores com 96 h de fermentação e cultivadas em placas de Petri contendo ágar nutriente preparado no caldo fermentado autoclavado e incubadas em jarra de anaerobiose (24 h a 37°C). Após o período de incubação, algumas colônias com diferentes características macroscópicas cresceram sob as condições estabelecidas (Figura 10) e estas foram selecionadas e isoladas em uma nova placa de Petri contendo ágar nutriente e incubadas em estufa por 24 h a 37°C.

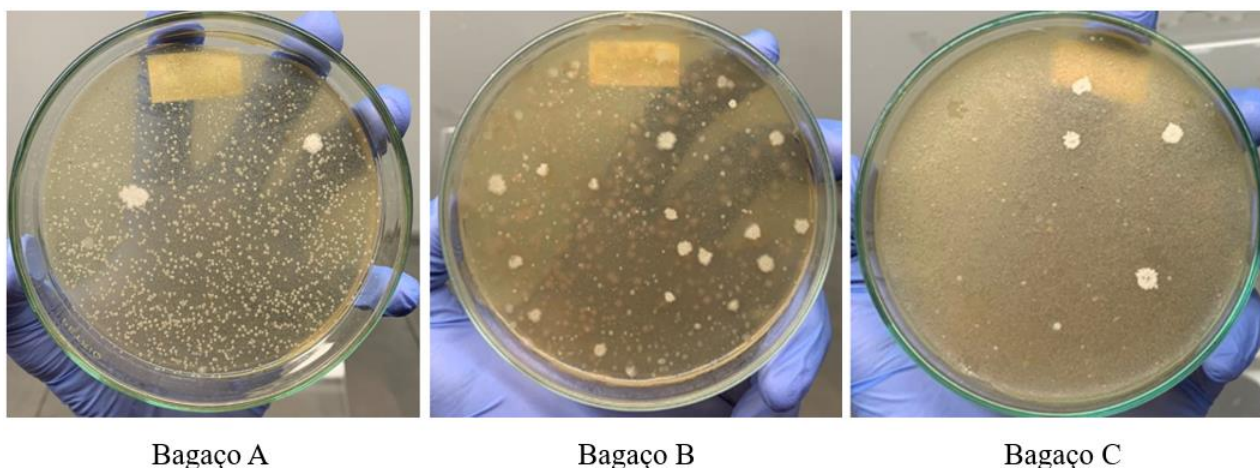


Figura 10. Colônias obtidas a partir dos bagaços A, B e C após 96 h de fermentação.

Desta forma, obteve-se ao final do isolamento três isolados a partir do bagaço A e dois isolados a partir dos bagaços B e do C. Apesar do ambiente fermentativo ter, provavelmente, uma elevada diversidade de grupos microbianos, as condições restritivas impostas na etapa de isolamento revelou uma baixa diversidade macroscópica de colônias isoladas. A maioria das bactérias oriundas de amostras ambientais não são cultiváveis em

meio de crescimento comercial. Usualmente, no ambiente natural, os microrganismos são mantidos por redes bioquímicas e de nutrientes específicas para atender suas necessidades metabólicas (Steinert *et al.*, 2014). O resultado da classificação morfotintorial das bactérias isoladas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Característica morfotintorial dos microrganismos isolados das amostras de BCA.

Bagaço	Isolado	Parede Celular	Morfologia
A	A1	Gram-negativa	Bacilo
	A2	Gram-positiva	Bacilo longo esporulante
	A3	Gram-negativa	Bacilo esporulante
B	B1	Gram-negativa	Bacilo esporulante
	B2	Gram-positiva	Bacilo longo esporulante
C	C1	Gram-positiva	Cocos
	C2 (cultura mista)	Indefinido	Bacilo e cocos

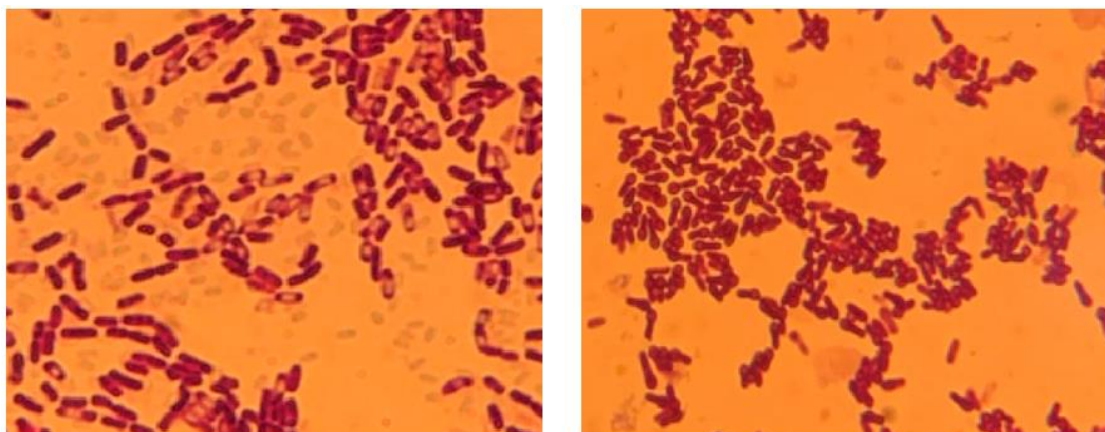
As bactérias isoladas foram identificadas por espectrometria de massas por meio da técnica MALDI-TOF, com exceção do cultivo C2 que não foi enviado por conter uma cultura mista, sendo então identificado por meio do sequenciamento do gene DNAr 16S. Dentre os resultados da identificação por espectrometria de massas, apenas os isolados A3 e B1, caracterizados morfologicamente como bactérias gram-negativas em formato de bacilos e produtores de esporos (Figura 11), não atingiram a pontuação mínima de identificação (< 1700), caracterizando um resultado não confiável e não identificado. Majoritariamente, bactérias esporulantes são gram-positivas, porém, algumas pesquisas já registraram um raro sistema de secreção específico no qual bactérias gram-negativas produzem esporos como mecanismo de sobrevivência em situações de estresse (Morlot e Rodrigues, 2018).

A esporulação é um processo morfológico complexo realizado por seres do filo Firmicutes e as bactérias gram-negativas esporulantes são pertencentes à classe Negativicutes (Poehlein *et al.*, 2013; Tocheva *et al.*, 2013). O trabalho de Tocheva e colaboradores (2013) analisou detalhadamente o processo de produção de esporos da bactéria gram-negativa *Acetonema longum*. Por meio do método de cromatografia eletrônica, os pesquisadores registraram, durante a produção de esporos, a síntese de

presença de mais de 20 genes referentes à capacidade de produção de enzimas extracelulares degradadoras de lignina, além de resultados positivos nos testes enzimáticos realizados. Desta forma, o isolado A1 apresenta elevado potencial biotecnológico devido aos seus produtos metabólicos, sendo promissor para testes futuros de fermentação bioaumentada do BCA.

A bactéria A2 apresentou probabilidade de pertencer ao gênero *Bacillus*, assim como detectado na microscopia realizada (Figura 12), o grupo é conhecido por sua forma em bacilos gram-positivos esporulantes, com metabolismo aeróbio facultativo. As cepas do gênero são conhecidas por sua alta capacidade de produção de enzimas extracelulares por meio da fermentação em condições variadas de pH e temperatura, atendendo a aplicações específicas da indústria (Schallmey *et al.*, 2004). Dentre a ampla gama de enzimas produzidas por *Bacillus*, inclui-se o complexo lignocelulolítico, tornando o grupo capaz de degradar a biomassa lignocelulósica. Tal função já foi confirmada no metabolismo de algumas espécies, como por exemplo, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (Sokolowski e Junior, 2020).

Para o isolado B2, o resultado obtido a partir da espectrometria de massas indicou a probabilidade de pertencer ao gênero *Brevibacillus*, um organismo gram-positivo em forma de bacilos e produtores de esporos, assim como indica a microscopia realizada. O gênero refere-se a organismos muito difundidos em diferentes habitats ambientais, com elevada taxa de crescimento, sendo uma excelente fonte de enzimas de interesse biotecnológico e um organismo aplicado na produção de proteínas heterólogas, incluindo citocinas (Panda *et al.*, 2014). A microscopia óptica realizada do isolado B2 está exposta na Figura 12.



Isolado A2

Isolado B2

Figura 12. Microscopia óptica (1000×) referente aos isolados A2 e B2.

A cepa C1 foi caracterizada, a partir da microscopia, como uma bactéria gram-positiva em formato de cocos. O resultado da espectrometria de massas definiu a cultura como pertencente ao gênero *Enterococcus*, com probabilidade de se referir à *Enterococcus casseliflavus*, uma bactéria gram-positiva em formato de cocos bem definidos, não formadora de esporos, a qual pode ser resistente a variações de pH, temperatura e concentração salina (Papadaki *et al.*, 2020). O gênero *Enterococcus* refere-se à bactérias naturais do trato intestinal de humanos e animais e, devido a sua grande ocorrência em fezes, é persistente em amostras ambientais, tendo sua presença como indicativo de contaminação em água (Torres *et al.*, 2018). Alguns trabalhos já registraram a produção de ácido láctico por *Enterococcus* sp. a partir da fermentação de diversas fontes de carbono, como por exemplo, trigo, milho, cevada e açúcares simples e mistos (Ziadi *et al.*, 2020). Tendo em vista a facilidade de cultivo e comum presença em amostras ambientais, é claramente possível que o isolado C1 se refira à alguma espécie do gênero.

De acordo com a análise da metagenômica, a cultura C2 foi determinada predominantemente como *Bacillus subtilis* (98,6%) e foi identificada também a presença de *Enterococcus* sp. (1,18%). Ao visualizar a cultura crescida em placa de Petri julgava-se a cepa isolada, porém, na microscopia óptica foi observada a presença de cocos em menor proporção, fazendo jus ao resultado obtido. Sendo assim, especula-se que a presença de *Enterococcus* em C2 refere-se a vestígios do isolado C1 que não foi desassociado. A Figura 13 apresenta a microscopia óptica dos dois isolados em questão.

A espécie *Bacillus subtilis* carrega as características expostas anteriormente sobre o gênero *Bacillus* e, em condições anaeróbias, produz ácido láctico, 2,3-butanodiol e ácido acético como principais produtos de fermentação (Zhang *et al.*, 2011). Sendo assim, todos os resultados de identificação dos microrganismos foram condizentes com a caracterização morfofototintorial realizada previamente. E de acordo com o metabolismo das cepas identificadas, visando o objetivo de degradar e fermentar o BCA bruto, os isolados A1, A2 e A3 são fortes candidatos para fermentação bioaumentada. Estes são microrganismos fermentadores com características lignocelulolíticas e/ou capazes de produzir etanol, ácidos, entre outros bioprodutos de interesse. Na Tabela 7 foram compiladas as informações obtidas sobre os microrganismos identificados.

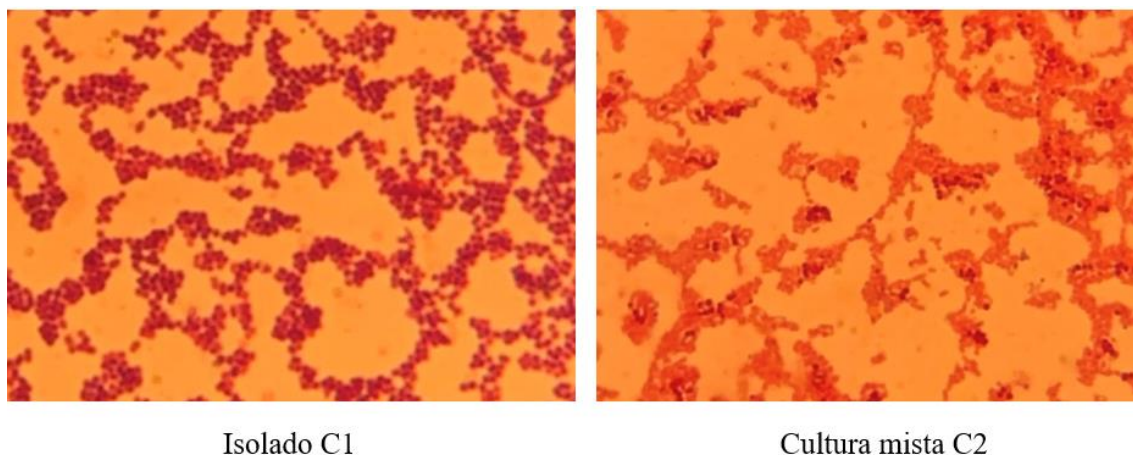


Figura 13. Microscopia óptica (1000×) referentes ao isolado C1 e à cultura mista C2.

Tabela 7. Resultado da identificação das cepas cultiváveis no tempo 96 h de fermentação.

Bagaço	Isolado	Gênero	Características	Referências
A	A1	<i>Klebsiella</i>	Capaz de produzir etanol, 2,3-butanodiol, hidrogênio e ácidos e também enzimas lignocelulolíticas	Li <i>et al.</i> , (2022) e Melo-Nascimento <i>et al.</i> , (2018)
	A2	<i>Bacillus</i>	Capaz de produzir enzimas extracelulares incluindo as do complexo lignocelulolítico	Sokolowskei e Junior, (2020)
	A3	-		
B	B1	-		
	B2	<i>Brevibacillus</i>	Alta taxa de crescimento e excelente fonte de enzimas de interesse biotecnológico	Panda <i>et al.</i> , (2014)
C	C1	<i>Enterococcus</i>	Resistente a variações de pH e temperatura Produz ácido lático	Papadaki <i>et al.</i> , (2020) e Ziadi <i>et al.</i> , (2020)
	C2	<i>Bacillus</i> (98,6%) <i>Enterococcus</i> (1,18%)	<i>Bacillus subtilis</i> produz ácido lático, 2,3-butanodiol e ácido acético	Zhang <i>et al.</i> , (2011)

(-) Não atingiu a pontuação mínima de identificação

7.2 Ensaio de fermentação das culturas isoladas utilizando glicose como substrato

Os microrganismos cultiváveis isolados a partir dos bagaços A, B e C foram submetidos à fermentação, utilizando glicose como substrato, com o intuito de analisar o metabolismo dos mesmos para definição de quais seriam destinados ao ensaio de fermentação bioaumentada do BCA acrescido da microbiota autóctone. O ensaio iniciou com glicose à 5 g/L, em meio mínimo e atmosfera anaeróbia. O monitoramento da curva

de crescimento foi realizado até 60 h de experimento e a análise dos metabólitos obtidos até 24 h. A Figura 14 apresenta a curva de crescimento dos isolados a partir da densidade óptica em 530 nm.

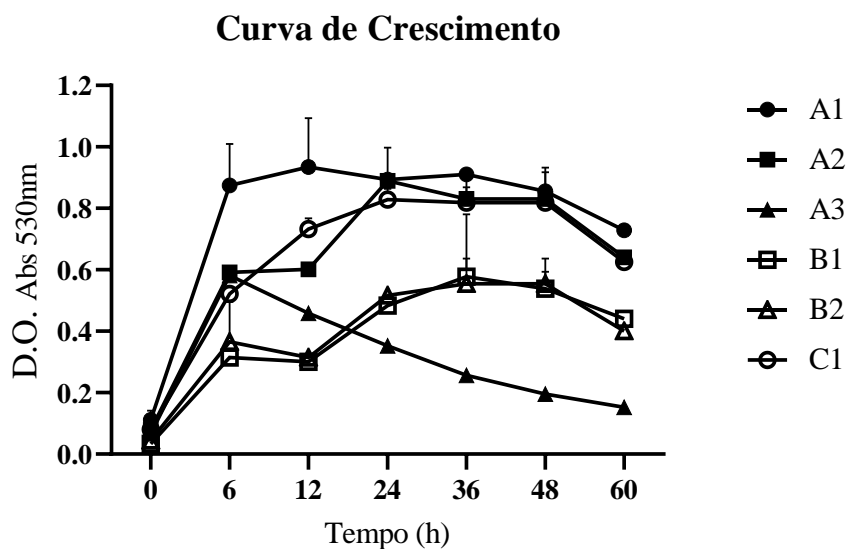


Figura 14. Curva de crescimento das culturas isoladas durante a fermentação com glicose (5 g/L).

Como foi realizado o pré-inóculo para este experimento as culturas iniciaram a fermentação em fase exponencial de crescimento. Como visto na Figura 14, o isolado com maior crescimento foi A1, atingindo uma D.O. de 0,935 nm. Com exceção do isolado A3, que iniciou a morte celular precocemente, todas as outras cepas atingiram a fase estacionária com 24 h de ensaio e a morte celular se iniciou após 36 h. O consumo de glicose, que será exposto a seguir (Figura 15), auxilia no entendimento deste comportamento.

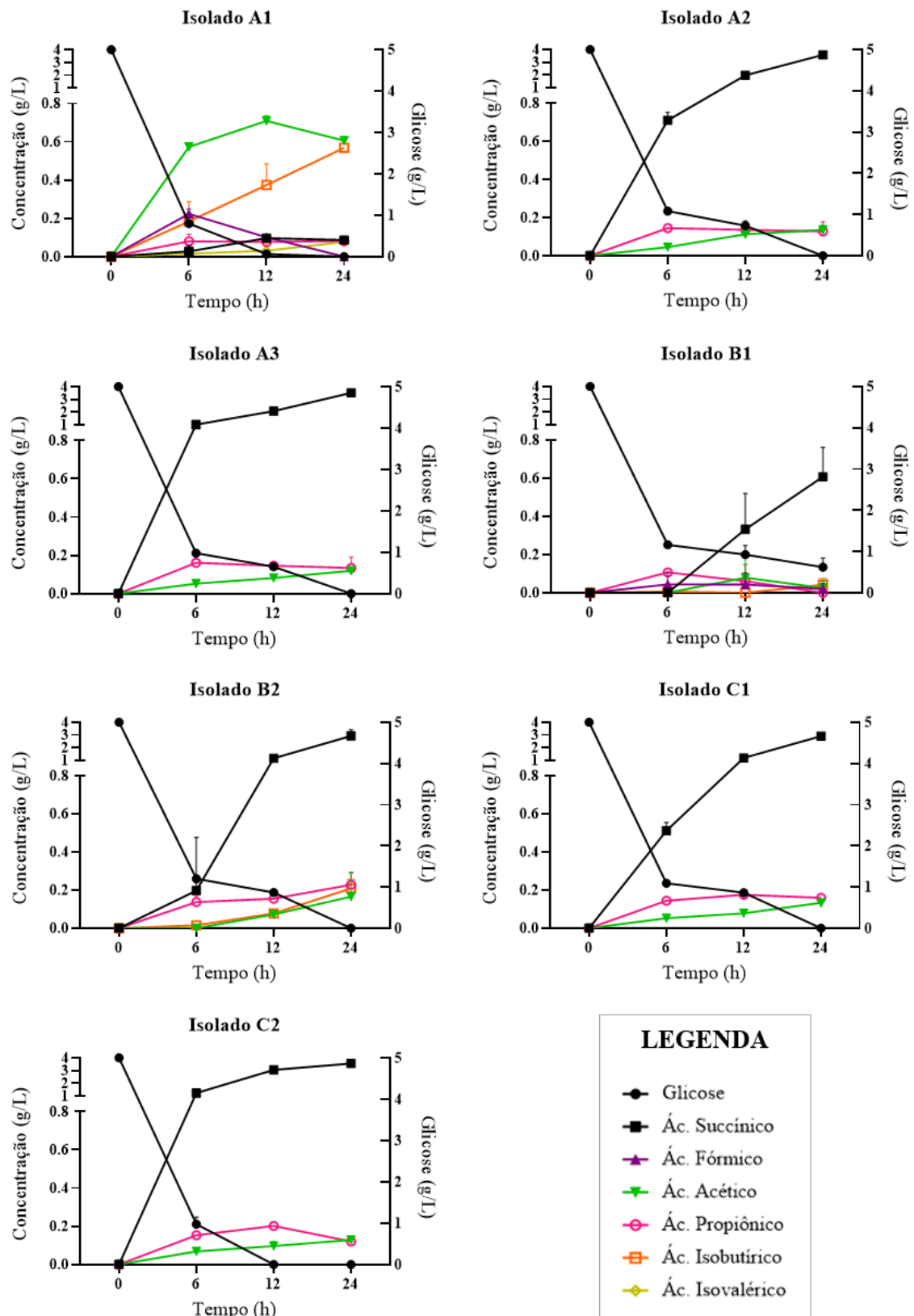


Figura 15. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir fermentação de glicose pelas culturas isoladas das amostras de BCA.

Percebe-se que a glicose foi rapidamente consumida nos reatores, apresentando um consumo entre 84–76% com 6 h de ensaio. Após 24 h, a fonte de carbono foi completamente consumida, com exceção do isolado B1, que neste momento ainda permaneceu com 0,63 g/L de glicose no reator. Esse perfil de consumo do substrato justifica o início da fase estacionária e posterior morte celular das cepas após este período do ensaio.

O metabólito obtido em maior concentração foi o ácido succínico, alcançando a produção máxima para os isolados A2 (3,58 g/L), C2 (3,55 g/L) e A3 (3,52 g/L), exceto para o isolado A1 onde não foi detectado. Tendo em vista a produção de ácido succínico obtida através da fermentação do BCA bruto (máxima de 0,22 g/L no bagaço C), a fermentação com culturas isoladas apresentou resultados superiores, uma vez que nestas não há competição metabólica e/ou dificuldade de acesso ao substrato. O ácido succínico é facilmente produzido através da fermentação bacteriana e apresenta uma ampla gama de aplicações na perspectiva de sua produção biológica para comercialização, devido seu elevado valor agregado (Raj *et al.*, 2023). De acordo com trabalhos publicados na literatura, é comum e relatada a produção de ácido succínico por bactérias dos gêneros *Bacillus* (A2 e C2), *Sporomusa* (A3) e *Enterococcus* (C1) (Ollivier *et al.*, 1985; Mumtaz *et al.*, 2019; Moshokoa *et al.*, 2023).

A fermentação de glicose pelo isolado A1, referente ao gênero *Klebsiella* com probabilidade de pertencer a espécie *Klebsiella pneumoniae*, se destacou pela produção de ácido acético (0,70 g/L). No trabalho de Wei e colaboradores (2013) foram testadas diferentes condições de fermentação por *Klebsiella pneumoniae* e em pH 6, com glicose a 35 g/L, alcançou-se a produção de ácido acético (5,9 g/L) e ácido succínico (2,8 g/L). A obtenção do ácido acético se dá pela clivagem do piruvato em acetil-COA, sendo esta uma via necessária para a célula microbiana devido ao fornecimento de ATP, podendo justificar assim, a presença deste ácido em todos os reatores do presente estudo (Xiu *et al.*, 2007; Zong *et al.*, 2017). Além do ácido acético, foi detectada a produção de ácido succínico, ácido isovalérico, ácido propiônico e ácido fórmico pelo isolado A1. Esses resultados tornam esse isolado um forte candidato para o ensaio bioaumentado com microbiota autóctone do BCA, pois além da obtenção de ácidos orgânicos de valor comercial, o gênero *Klebsiella* também é conhecido pela sua capacidade lignolítica (Melo-Nascimento *et al.*, 2018).

Além do reator A1, também foi detectada a produção de ácido isobutírico pelos isolados B1 (0,04 g/L) e B2 (0,20 g/L), e de ácido fórmico em B1 (0,04 g/L). Na

fermentação das demais cepas bacterianas houve a produção, em semelhantes concentrações, de ácido acético e ácido propiônico. Desta forma, a escolha dos isolados para direcionamento do posterior ensaio bioaumentado se deu pelos isolados A1 (*Klebsiella*), A2 (*Bacillus*) e A3 (*Sporomusa*), além dos produtos gerados, a seleção foi feita com base na diferença de gênero entre os grupos, selecionando três grupos promissores e distintos, para maior possibilidade de sucesso no processo fermentativo.

7.3 Caracterização metagenômica da microbiota autóctone do bagaço de cana-de-açúcar

A partir da caracterização metagenômica obteve-se a identificação taxonômica dos microrganismos autóctones, envolvendo Bacteria e Archaea, em todos os níveis de classificação. Sendo assim, para as amostras de bagaço A, B e C, foi analisado o consórcio microbiano presente nos tempos 0, 96 e 408 h e concluiu-se que a microbiota presente sofreu alteração ao longo do processo fermentativo nas três amostras testadas. O domínio predominante foi Bacteria, envolvendo os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Ratti e colaboradores (2015) que relataram a presença dos filos Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes em ensaios fermentativos utilizando o BCA como fonte de microrganismos e substrato para produção de hidrogênio. Os pesquisadores observaram a influência de bactérias fermentadoras celulolíticas que favorecem a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos, como por exemplo, as do gênero *Clostridium*. A Figura 16 exibe o gráfico da riqueza de gênero e espécie identificada durante a fermentação dos BCA A, B e C.

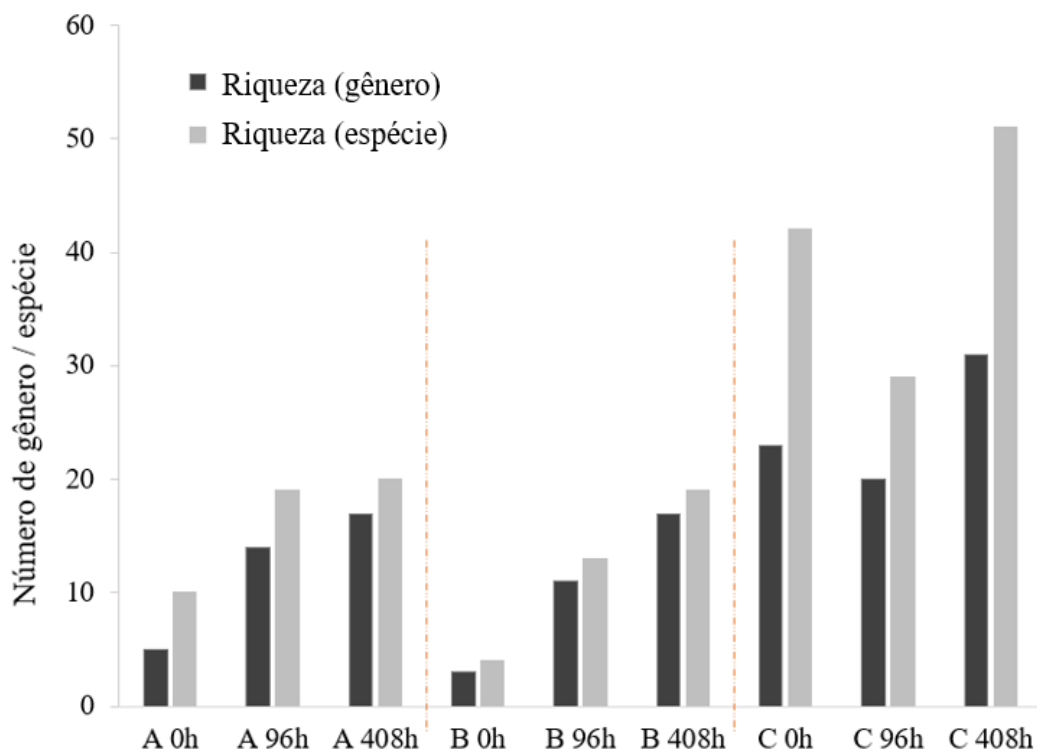


Figura 16. Riqueza de gênero e espécie nos tempos 0 h, 96 h e 408 h de fermentação para as amostras de bagaço de cana-de-açúcar A, B e C.

Para os bagaços A e B, a riqueza do consórcio microbiano aumentou ao longo da fermentação, alcançando 20 e 19 gêneros, respectivamente, após 408 h de ensaio. Já para o reator do bagaço C, a diversidade de microrganismos apresentou uma queda no tempo 96 h e, posteriormente, no final do ensaio, ultrapassou os números do tempo 0 h alcançando 51 gêneros identificados. O aumento da riqueza de microrganismos ao longo do processo fermentativo da biomassa lignocelulósica se deve à sua degradação pela ação enzimática dos organismos presentes, tendo como consequência a disponibilização dos açúcares no meio, e também devido à produção de metabólitos posteriormente consumidos. Isto é, durante fermentações duradouras, há alteração de espécies em função das mudanças sutis em nutrientes, pH e alcance de condições otimizadas (Tu *et al.*, 2019). Desta forma, espécies de bactérias que não são identificadas no início do processo fermentativo, devido a baixas concentrações não detectadas pelos métodos de identificação, podem proliferar ao longo do ensaio à medida que as condições do meio favoreçam seus metabolismos.

Para os bagaços D, E e F, a metagenômica foi analisada apenas no tempo 96 h, uma vez que este é o momento com maior atividade metabólica dos microrganismos

presentes, devido à disponibilidade de substrato, quando se compara com os tempos 0 e 408 h. Na Tabela 8 são demonstradas a riqueza de família, gênero e espécie identificada no momento proposto e os dados dos bagaços A, B e C foram incorporados para comparação.

Tabela 8. Riqueza de família, gênero e espécie presente nos BCA com 96 h de fermentação.

BCA	N.º família	N.º gênero	N.º espécie
A	14	19	43
B	11	13	35
C	20	29	55
D	31	51	112
E	28	53	115
F	25	51	109

Ultrapassando a riqueza de família, gênero e espécie dos bagaços primeiramente analisados (A, B e C), os bagaços D, E e F apresentaram uma diversidade de microrganismos considerável com 96 h de fermentação, sendo identificadas até 115 espécies em E. Esta alta variedade de cepas bacterianas confirma a diferença da microbiota autóctone de cada bagaço e, os metabólitos produzidos durante a fermentação, demonstrarão com mais propriedade as consequências desta abundância.

De acordo com os gêneros identificados nas seis amostras de BCA analisadas, houve semelhanças e variações entre a microbiota destes, demonstrando que, a origem, o processamento e o armazenamento da amostra podem influenciar nos organismos presentes nas mesmas. Na Figura 17 é apresentado o gráfico da abundância relativa (> 1%) dos gêneros identificados, a partir da análise metagenômica, dos bagaços A, B e C nos tempos 0, 96 e 408 h. A microbiota do início e final destes ensaios serão primeiramente discutidas para que, posteriormente, o tempo 96 h seja analisado, incluindo os resultados dos bagaços D, E e F neste momento.

Abundância Relativa - GÊNERO

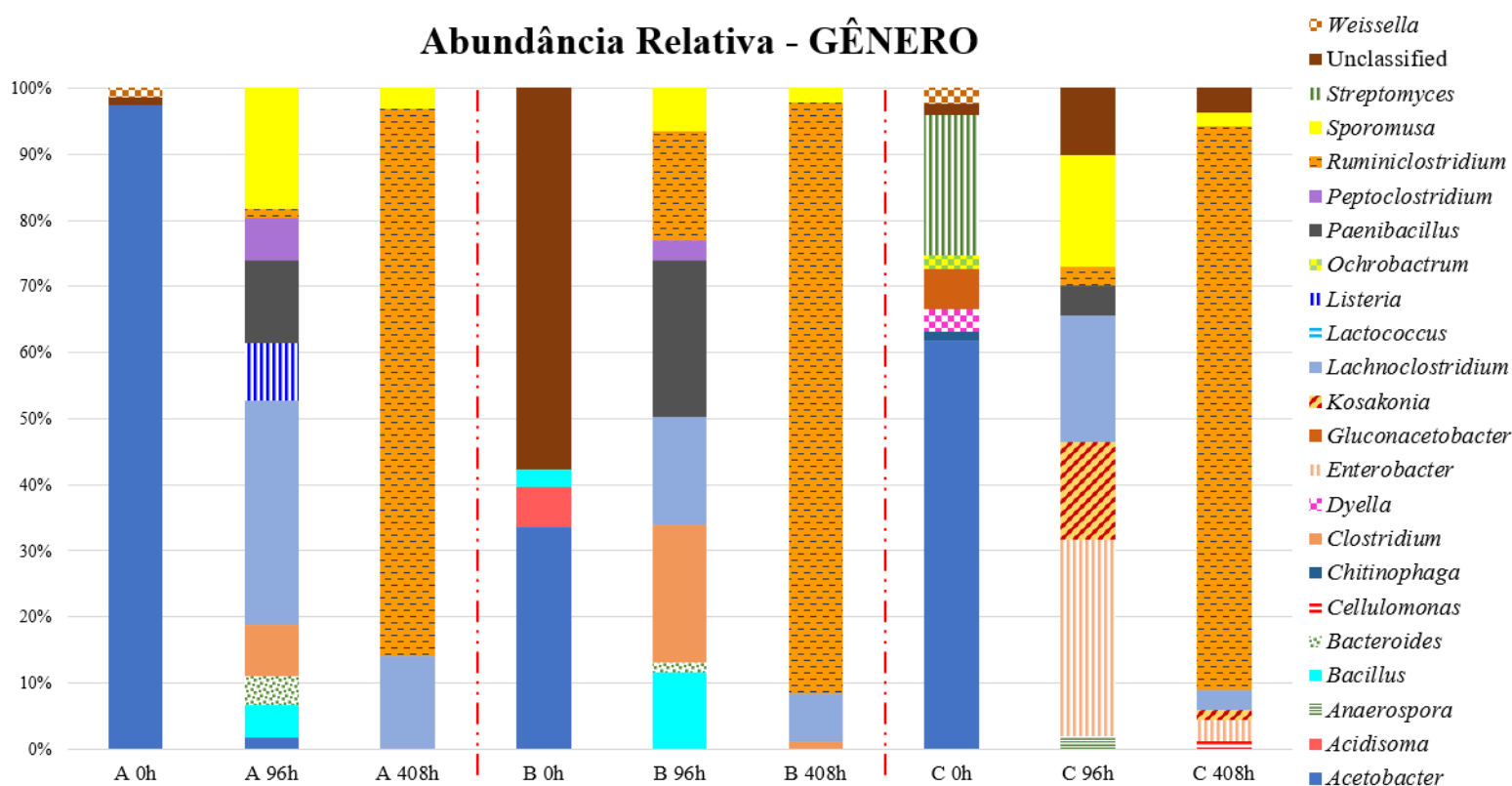


Figura 17. Gráfico da abundância relativa (>1%) em nível de gênero da microbiota autóctone dos bagaços de cana-de-açúcar (A, B e C) nos tempos 0 h, 96 h e 408 h de fermentação.

Como demonstrado, no tempo 0 h houve a presença expressiva do gênero *Acetobacter* nas três amostras, com abundância relativa de 96,3% para o bagaço A, 33,5% para o bagaço B e 52,9% para o bagaço C. A presença do gênero *Acetobacter*, além da produção de ácido acético, está intimamente relacionada com a produção de celulose. De acordo com o estudo de Son *et al.*, (2001), as bactérias do gênero alcançaram uma produção de 3,8 g/L de celulose e com adição de etanol ao meio de cultivo (1,4% v/v) a concentração de celulose obtida foi de 15,2 g/L. Em nível de espécie, a bactéria foi identificada como *Acetobacter pasteurianus* nos três bagaços, ou seja, um organismo tolerante ao etanol e ácidos orgânicos, que utiliza como fonte energética ácido lático e manitol, por exemplo, e é capaz de produzir, além da celulose, ácido acético, vinagre de álcool, ácido glucônico e um precursor do ácido ascórbico (Chandra Raj *et al.*, 2001; Mounir *et al.*, 2016).

Assim sendo, a presença de *Acetobacter pasteurianus* nas amostras de BCA no início do ensaio pode contribuir para o enriquecimento do meio fermentativo por meio da

produção de celulose a partir de glicose e, conseqüentemente, favorecer o crescimento de outras espécies fermentadoras capazes de degradar este polissacarídeo, acarretando a obtenção de outros produtos de interesse.

Outro grupo em comum entre os bagaços no início do ensaio de fermentação foi dado como indefinido em nível de gênero, porém identificado como pertencente à família Enterobacteriaceae. Essa foi predominante no bagaço B, com uma abundância relativa de 57,7%, e menos presente nos bagaços A e C com abundância de 1,19% e 1,38% respectivamente. Membros da família Enterobacteriaceae referem-se à uma ampla gama de espécies de bactérias promissoras biotecnologicamente por serem capazes de gerar diversos produtos de valor agregado, alguns gêneros são *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* e *Shigella* (Farmer *et al.*, 2010).

O bagaço A não apresentou nenhum gênero exclusivo em relação às outras amostras no momento inicial da fermentação. No bagaço B foi registrada a presença de *Acidisoma* (6%) e *Bacillus* (2,6%). E os gêneros particulares do bagaço C foram *Streptomyces* (18,2%), *Gluconacetobacter* (5,23%), *Lactobacillus* (3,39%), *Dyella* (2,89%), *Weissella* (2,07%), *Ochrobactrum* (1,67%). Levando em consideração a necessidade inicial de degradação do BCA, os microrganismos produtores de alguma enzima lignocelulolítica contribuem com o início do bioprocessamento consolidado pretendido. Dentre os gêneros citados, *Bacillus* identificado no bagaço B, e *Streptomyces* e *Lactobacillus* oriundos do bagaço C atendem a essa expectativa (Njoku e Antai, 1987; Zhang *et al.*, 2011).

Sobre a microbiota presente no final do ensaio, após 408 h de fermentação, a semelhança entre as três amostras foi expressiva. O gênero predominante neste momento foi *Ruminiclostridium*, com abundância relativa de 79,7% no bagaço A, 86,9% no B e 72,9% no C. Para as três amostras de BCA, o organismo em questão foi identificado em nível de espécie como *Clostridium termitidis*, um sinônimo homotípico de *Ruminiclostridium termitidis*, uma bactéria anaeróbia, mesofílica, formadora de esporos e que cresce em pH neutro (Reimer *et al.*, 2022).

Os outros gêneros presentes nos três reatores ao final do ensaio foram *Lachnoclostridium* com presença de 13,5% em A, 7,1% em B e 2,9% em C. E também *Sporomusa* com abundância de 2,9% em A, 2,1% em B e 2% em C. Além dos gêneros citados, o bagaço B obteve apenas *Clostridium* (1%) como exclusividade e o bagaço C *Enterobacter* (3%), *Kosakonia* (1,5%) e *Cellulomonas* (1,1%). Com exceção destes três gêneros exclusivos do bagaço C (que indicam 4,2% da microbiota total deste reator),

todos os gêneros identificados no tempo 408 h são produtores de esporos. Isto é, pode ser que a caracterização metagenômica, neste momento, foi realizada com base nos esporos produzidos por estes microrganismos, uma vez que, após 17 dias de fermentação as condições de cultivo podem não ser mais favoráveis para que os organismos se mantenham ativos.

Levando em consideração a abundância relativa acima de 1%, o tempo 96 h foi o que mais apresentou diversidade de microrganismos. Neste momento, os reatores dos seis bagaços foram analisados quanto à sua metagenômica e a Figura 18 mostra estes resultados.

Abundância Relativa - GÊNERO (96 horas)

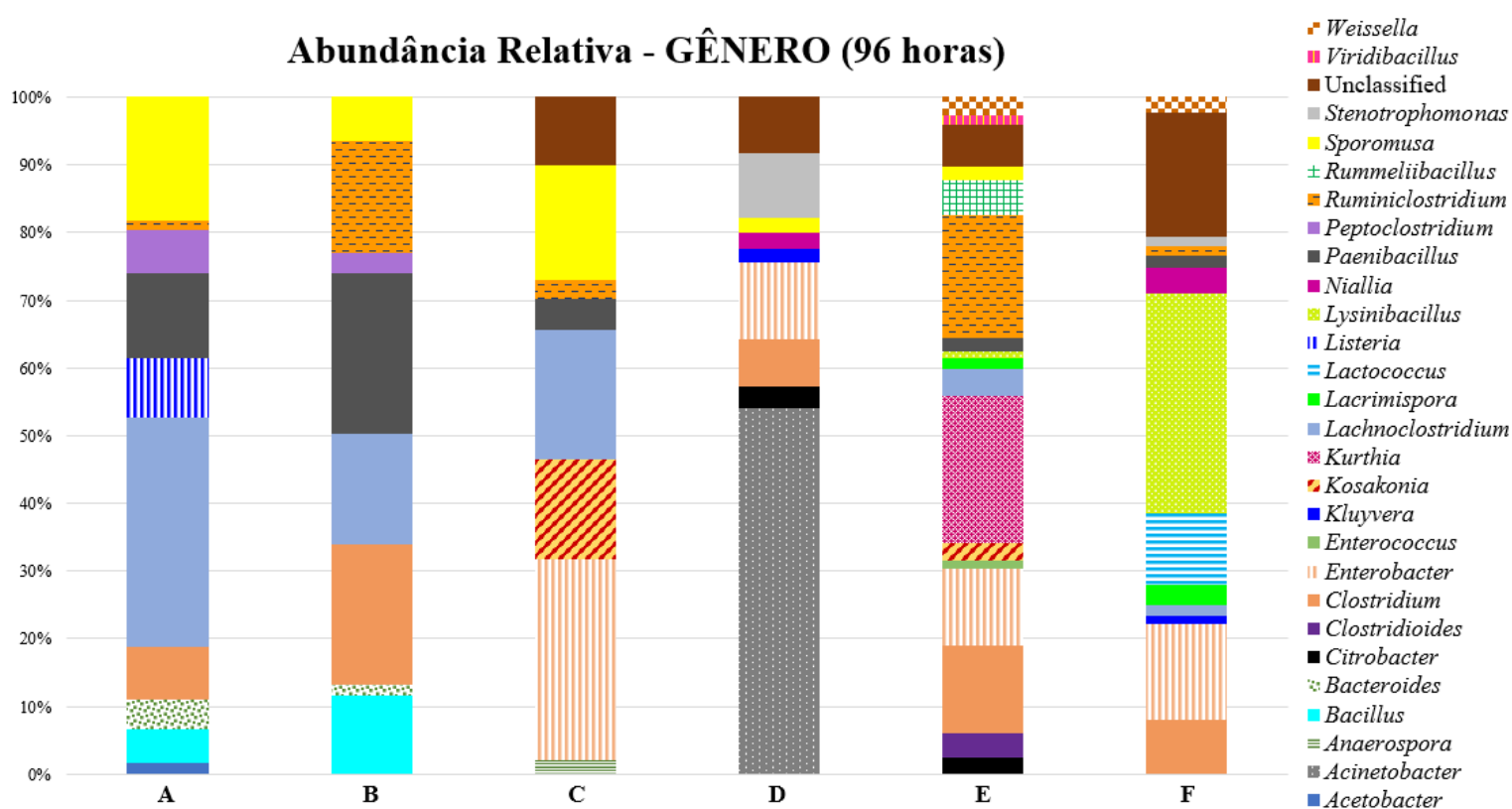


Figura 18. Gráfico da abundância relativa (>1%) em nível de gênero da microbiota autóctone dos seis bagaços de cana-de-açúcar (A, B, C, D, E e F) com 96 h de fermentação.

Discutindo primeiramente as maiores semelhanças entre os bagaços, observa-se a presença de *Clostridium* em A (7,6%), em B (20,4%), em D (6,4%), em E (12,1%) e em F (7,3%). Com capacidade de produzir etanol, acetato e/ou butirato, bactérias do gênero *Clostridium* são anaeróbias e aptas a degradar diversos polissacarídeos através de um complexo multi-enzimático altamente eficiente denominado celulosoma. Além disso,

também utilizam hemiceluloses como substrato e podem produzir ácidos durante a fermentação (Andreesen, Bahl e Gottschalk, 1989). Sendo assim, a presença destas cepas contribui com a degradação do material lignocelulósico, bem como a obtenção de metabólitos de valor agregado.

O gênero *Sporomusa*, exposto anteriormente como suspeita de se referir aos isolados A3 e B1, apresentou abundância de 18% no reator do bagaço A, 6,3% em B, 16,1% em C e aproximadamente 2% nos reatores D e E. A presença destes microrganismos acarreta na produção de ácido acético por meio do consumo de álcoois primários, ácidos orgânicos, 2,3-butanodiol e também são capazes de metabolizar açúcares como glicose, manitol e frutose (Biebl *et al.*, 2000; Balk *et al.*, 2010). Desta maneira, durante o processo fermentativo do BCA, estas bactérias possivelmente consomem etanol, ácidos orgânicos e açúcares disponíveis para suprir seu metabolismo acetogênico.

Outro gênero em comum entre amostras de BCA após 96 h de fermentação é *Ruminiclostridium*, com aparição de 1,4% no bagaço A, 16% em B e E, 2,5% em C e 1,2% em F. Trata-se de bactérias anaeróbias com capacidade de consumir celulose, celobiose, glicose e xilose, produzindo ácido acético, etanol e hidrogênio (Wu e Cheng, 2021). Principalmente para os bagaços B e E, os quais exibem maior abundância, organismos do gênero podem contribuir para o consumo dos açúcares liberados durante a fermentação e, portanto, favorecer a obtenção dos produtos citados.

Identificado nos bagaços A, B, C e E, o gênero *Lachnoclostridium* ocorreu com uma abundância relativa de 33,6% em A, 16,1% em B, 18,2% em C e 3,7% em E. As *Lachnoclostridium* são bactérias gram-negativas anaeróbias e celulolíticas, usualmente encontradas em fezes humanas e no ambiente. Possivelmente seu crescimento foi favorecido devido a condições mesofílicas, pH neutro e à sua capacidade de consumir mono e dissacarídeos, tendo como principal produto de fermentação o ácido acético (Yutin e Galperin, 2013).

Sobre a presença de *Enterobacter*, foi identificada abundância relativa do gênero em C (28,3%), em D e E (10%) e em F (13%) após 96 h de fermentação. Estas cepas são consideradas bactérias anaeróbias facultativas capazes de produzir etanol e ácidos orgânicos a partir de glicose, xilose, arabinose e glicerol (Farmer *et al.*, 2010). Podendo assim, ser um dos gêneros responsáveis pela obtenção de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo do BCA.

Paenibacillus apresentou ocorrência de 12,2% em A, 23,3% em B, 4,3% em C e 1,7% em E. Representantes deste gênero são tipicamente anaeróbios facultativos e têm capacidade de degradar hexoses e pentoses, produzindo etanol e ácido acético (Jessen *et al.*, 2015), sendo este, mais um grupo colaborador para a fermentação do BCA e geração de bioprodutos.

Kosakonia representou 14% da microbiota autóctone do reator do bagaço C e 2,3% no reator E. Com indícios de se referir à espécie *Kosakonia oryzae*, uma bactéria aeróbia facultativa, capaz de metabolizar diversos açúcares, como por exemplo, arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, manose e sacarose. Esta é uma bactéria endofítica que auxilia o crescimento de plantas e tem a capacidade de produzir acetoina, arginina e a enzima β -galactosidase (Li *et al.*, 2017).

Referente às particularidades em destaque que ocorreram em alguns reatores, observou-se a relevante presença do gênero *Acinetobacter* no reator do bagaço D, com abundância relativa de 50% após 96 h de fermentação. A espécie foi identificada como *Acinetobacter baumannii*, uma gram-negativa com ampla ocorrência na natureza, sendo facilmente encontrada em águas superficiais e solo (Muhammed *et al.*, 2021). Esta é uma bactéria lignolítica, a qual foi de grande importância no mapeamento da degradação de lignina realizado no trabalho de Virmani e colaboradores (2023), contribuindo diretamente com a ruptura do material lignocelulósico no reator D.

Sobre o reator E, o gênero com maior ocorrência (20%) foi *Kurthia*, sendo este um grupo exclusivo deste bagaço. O gênero refere-se a bactérias gram-positivas, aeróbias e não esporulantes, as quais podem produzir ácidos a partir de substratos de fácil acesso (Stackebrandt, Keddie e Jones, 2006). E o gênero *Lysinibacillus* foi a maior exclusividade do reator F com abundância relativa de 30%, sendo 28% referente à espécie *Lysinibacillus fusiformis*, uma bactéria em forma de bastonete, gram-positiva, aeróbia e formadora de esporos. Além da ação antifúngica, atua como promotora de crescimento vegetal e possui capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares constituídos por xilose, arabinose, galactose, ramnose e glicose em combinações variadas (Mathivanan *et al.*, 2021; Passera *et al.*, 2021).

Sobre os demais organismos identificados em menor porcentagem, foram verificadas cepas com características celulolíticas e com capacidade de produzir etanol, ácido acético e outros metabólitos como os gêneros *Peptoclostridium*, *Bacillus* e *Bacteroides*. Com metabolismo acidogênico, foram identificadas bactérias do gênero *Listeria*, as quais são capazes de metabolizar glicose, manose, celobiose e frutose (Orsi e

Wiedmann, 2016). E houve a ocorrência de algumas bactérias acetogênicas como, por exemplo, *Acetobacter* e *Anaespora* (Bao e Li, 2017).

Assim sendo, de maneira geral, o tempo 96 h de fermentação passou a ser favorável para o crescimento de bactérias fermentadoras, muitas vezes produtoras de ácidos, principalmente ácido acético, etanol e outros bioprodutos particulares do metabolismo de cada gênero ou espécie. Pode-se dizer que todos os organismos são mesofílicos e crescem bem em pH neutro. Uma vez que a temperatura do ensaio se manteve a 37°C e o pH inicial do meio fermentativo foi de 7,18. Muitos dos gêneros identificados são capazes de degradar diferentes açúcares, inclusive os que fazem parte da estrutura química do BCA. E sobre a capacidade celulolítica, importante para a degradação da estrutura recalcitrante da biomassa, os microrganismos identificados foram principalmente: *Clostridium* (A, B, C, E e F), *Ruminiclostridium* (A, B, C, E e F), *Lachnospirillum* (presente em A, B, C e E), *Bacillus* (A e B), *Bacteroides* (A e B), *Peptoclostridium* (A e B).

Com o objetivo de visualizar graficamente a similaridade entre a microbiota autóctone dos bagaços durante a fermentação, foi feito o escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) – exposto na Figura 19 – em nível de espécie, utilizando o programa estatístico R, para que os dados discutidos anteriormente sejam expostos de maneira mais efetiva.

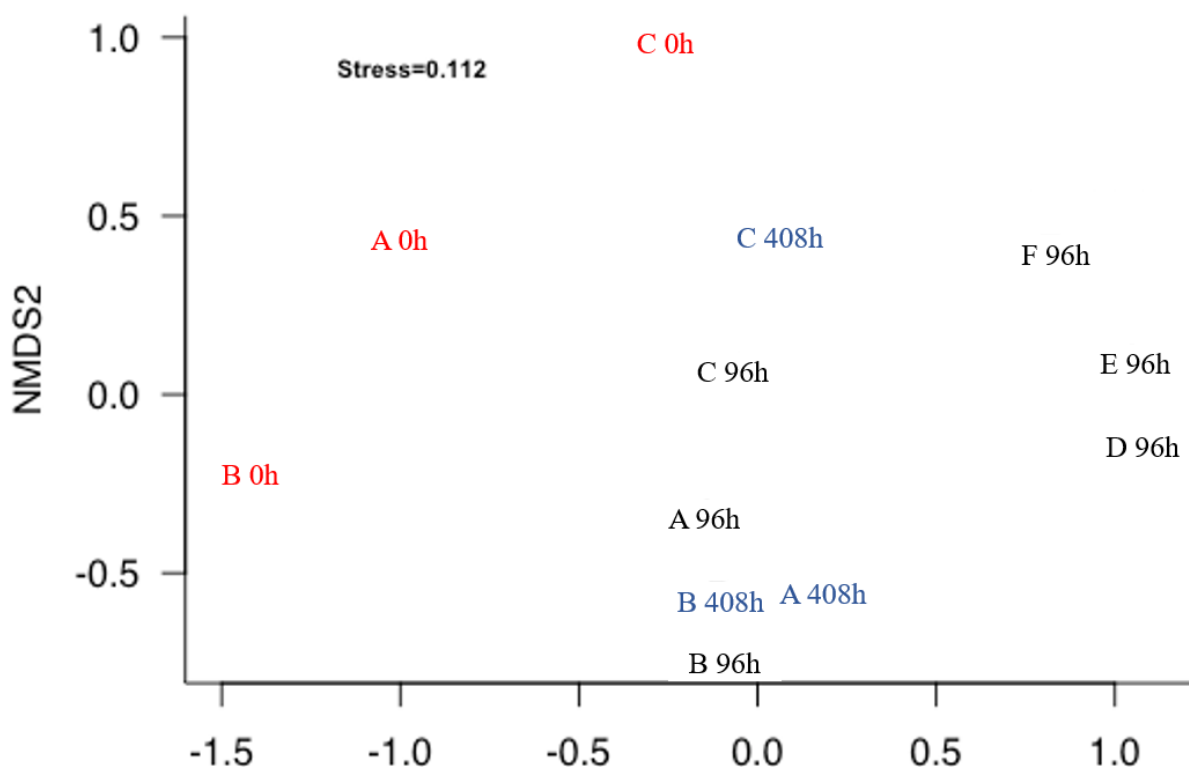


Figura 19. Escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) das espécies identificadas nos reatores durante a fermentação dos bagaços de cana-de-açúcar (A, B, C, D, E e F) nos tempos estipulados (0 h, 96 h e 408 h).

Observando a distância entre os grupos (stress = 0,112) percebe-se que as composições da microbiota dos bagaços, nos momentos estipulados para análise, se aproximam. Para o tempo 0 h, o bagaço A se aproxima de B e C em proporções equivalentes, havendo maior dissimilaridade entre estes dois últimos. O que aproxima os três grupos no tempo 0 h é a considerável presença do gênero de *Acetobacter* nos três reatores (96,3% em A, 33,5% em B e 52,9% em C).

Ao considerar a microbiota no tempo 96 h, único momento em que todas as amostras foram analisadas, nota-se maior semelhança entre os reatores A, B e C. Percebe-se que os microrganismos presentes nos reatores A e B não sofreram grandes alterações relativas até alcançar o final do ensaio (408 h), além de serem similares entre eles, uma vez que, A e B nos tempos de 96 h e 408 h estão bem próximas no gráfico. Os bagaços D, E e F também são similares com 96 h de fermentação. O bagaço C, ao final do ensaio, se distanciou dos bagaços A e B neste momento, uma vez que, como citato anteriormente,

este apresentou 3 gêneros exclusivos (*Enterobacter*, *Kosakonia* e *Cellulomonas*) com 408 h de fermentação.

Desta forma, analisando o escalonamento multidimensional não métrico (nMDS), percebe-se que a microbiota presente nos reatores no início do ensaio é mais distinta que nos outros momentos, ou seja, no decorrer da fermentação de cada reator, o consórcio presente foi se tornando mais similar com 96 h de experimento, não havendo grandes alterações até o momento final.

É válido ressaltar também que amostras de BCA apresentam diferenças microbianas mesmo que sejam oriundas da mesma usina de álcool e submetidas à mesma metodologia de processamento. Os bagaços A e D, por exemplo, são da mesma usina e, por serem de safras diferentes, apresentaram diferenças notáveis entre os microrganismos identificados. Percebe-se isto pela distância entre estes grupos com 96 h de fermentação na Figura 19.

Como discutido na Seção 5.5, trabalhos como os de Mello *et al.* (2016), Soares *et al.* (2019) e Gebbie *et al.* (2020) analisaram a microbiota presente no BCA, porém, dentre os trabalhos disponíveis na literatura até o presente momento, não houveram pesquisas que realizaram a comparação entre o consórcio microbiano de diferentes amostras de BCA, bem como a análise da alteração do mesmo ao longo do ensaio de fermentação, reforçando o ineditismo das informações obtidas no presente estudo.

7.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

Uma das formas de avaliar a degradação e hidrólise do BCA é por meio da caracterização química de sua estrutura antes e após 408 h de fermentação. Desta maneira, é possível avaliar os teores (% em base seca) de celulose, hemiceluloses e lignina, além dos teores de inorgânicos, extrativos e produtos de degradação (compostos fenólicos) presentes na biomassa lignocelulósica.

A Figura 20 expõe os gráficos referentes à caracterização da fração residual lignocelulósica comparando os dados do início e do final do ensaio. Os valores referentes aos compostos fenólicos não foram expostos pois não houve presença destes na estrutura dos BCA em nenhum momento na fração sólida analisada, o que é uma vantagem, uma vez que estes produtos, oriundos da degradação da lignina, são inibidores enzimáticos que afetam diretamente a hidrólise da biomassa lignocelulósica (Verardi *et al.*, 2020). Este resultado confirma que o bioprocessamento consolidado não enfrenta o problema limitante

e recorrente dos pré-tratamentos químicos ou físico-químicos, que é a produção de inibidores e/ou compostos tóxicos ao processo de hidrólise.

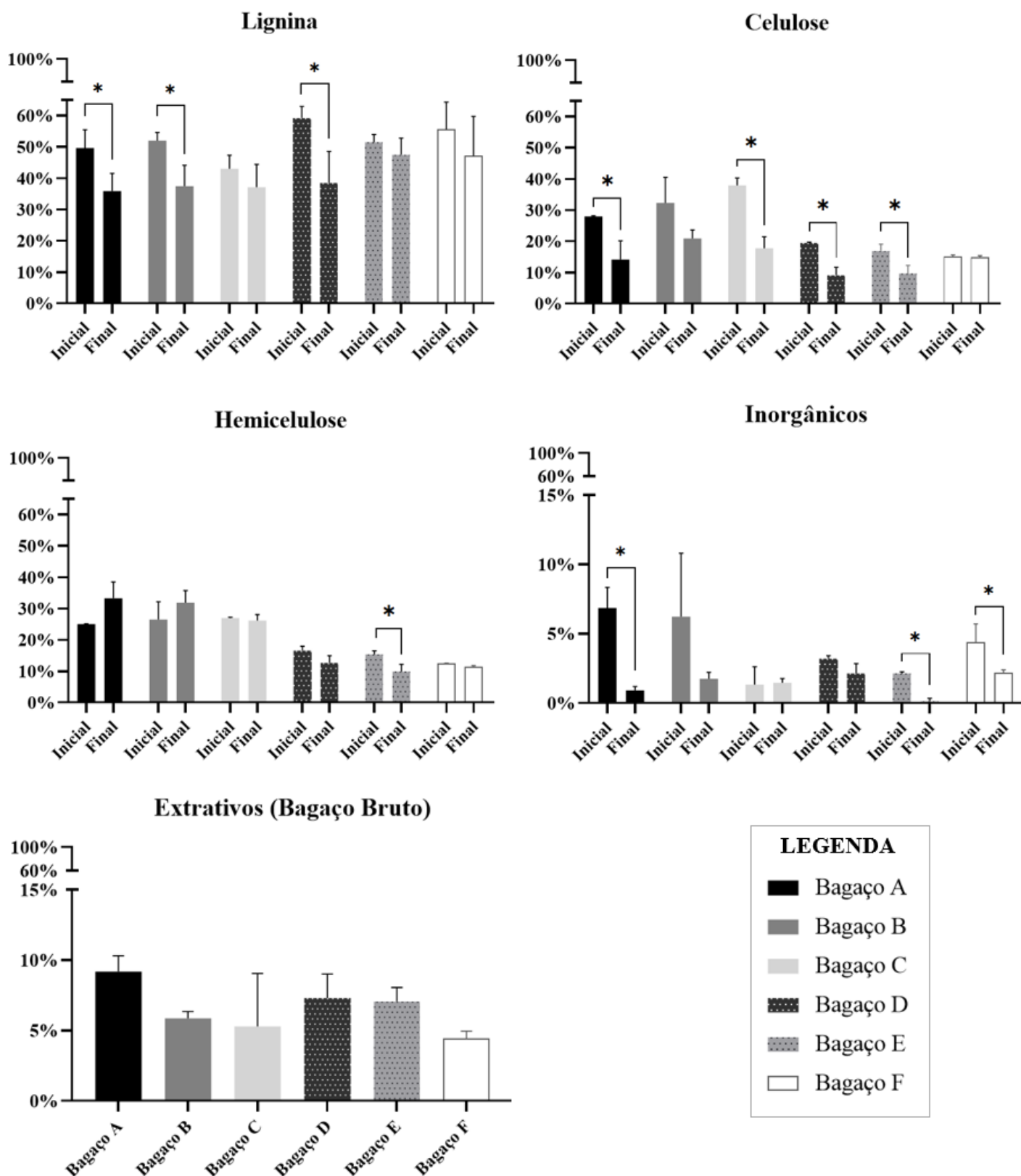


Figura 20. Gráficos da caracterização da estrutura química dos bagaços de cana-de-açúcar no início e final do ensaio de fermentação. O símbolo (*) indica diferença estatística entre os grupos indicados ($p < 0,05$).

Levando em consideração que a primeira etapa do uso do BCA como substrato é a degradação da sua estrutura lignocelulósica, analisaremos em um primeiro instante os teores de lignina obtidos. Percebe-se que nos reatores dos bagaços A, B e D ocorreu uma queda significativa dos teores de lignina na estrutura da biomassa ($p < 0,05$), decaindo em 27,9% nos dois primeiros e em 35% em D. Sabendo que a recalcitrância da lignina oferece à biomassa lignocelulósica restrição à acessibilidade dos açúcares presentes, para geração de bioprodutos, é necessário a despolimerização desta macromolécula, processo que não ocorre facilmente (Devi *et al.*, 2021). Uma vez que houve remoção de lignina nos reatores, entende-se que estes bagaços apresentaram organismos lignolíticos e que possivelmente celulose e hemiceluloses foram disponibilizadas ao meio de fermentação.

Na Tabela 9 são apresentados resultados de trabalhos que avaliaram as taxas de remoção de lignina através da utilização de diferentes pré-tratamentos com a intenção de desestruturar o BCA para disponibilização de seus açúcares. Tendo em vista os dados da literatura, conclui-se que a taxa de remoção de lignina alcançada no presente estudo é consideravelmente competitiva devido ao seu custo-benefício, uma vez que pré-tratamentos demandam maiores investimentos e, muitas vezes, empregam reagente químicos. E comparando com métodos que também implementaram o pré-tratamento biológico (fermentação), o presente estudo garantiu melhores resultados quando apostou na fermentação pela microbiota autóctone dos reatores A, B e D, os quais obtiveram uma remoção de lignina entre 27,9% e 35%.

Tabela 9. Pré-tratamentos utilizados para remoção de lignina de biomassa lignocelulósica.

Método utilizado	Remoção de lignina (%)	Referência
Organosolv	73%	Tsegaye <i>et al.</i> , 2019
Oxidação úmida	50%	Martín <i>et al.</i> , 2007
Hidrotermólise	35%	Ståhl <i>et al.</i> , 2018
Fermentação (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>)	19,62%	Pellinen <i>et al.</i> , 1989
Explosão a vapor	7.9 ± 9.1%	Rocha <i>et al.</i> , 2012
Fermentação (<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>)	6 – 10%	Gupta <i>et al.</i> , 2011
Fermentação (microbiota autóctone BCA)	27,9% – 35%	Este estudo

Dos isolados bacterianos com potencial lignolítico presentes em maior abundância exclusivamente nos reatores A e B, cepas do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus*, podem ter

contribuído com a degradação de lignina durante o processo fermentativo. Em relação ao reator D, como discutido anteriormente, houve a significativa ocorrência do gênero *Acinetobacter* (50% no tempo 96 h), grupo com grande potencial lignolítico registrado. Para os demais bagaços (C, E e F) não houve diferença estatística entre os valores iniciais e finais de lignina presente na biomassa.

A queda na porcentagem de celulose, com 5% de significância, presente nos BCAs durante a fermentação ocorreu nos reatores A, C, D e E. Em A, no início do ensaio, 27,9% da estrutura do bagaço se referia aos teores de celulose e ao final do ensaio esse valor foi reduzido para 14,1%, ou seja, 49,2% da celulose presente na biomassa foi solubilizada e/ou biodegradada pela microbiota autóctone. Para os reatores dos bagaços C e D houve a remoção de 53% da fração celulósica, e de 43% para o reator E. Estes resultados são bastante favoráveis e a capacidade celulolítica pode ser atribuída aos gêneros *Ruminiclostridium*, *Lachnoclostridium*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, dentre outros.

No trabalho de Menegatto (2019) também foi feita a comparação da caracterização do BCA antes e após a fermentação. Utilizando o BCA bruto como substrato, foram testados como fermentadores a microbiota autóctone e outras 6 combinações de consórcios bioaumentados com capacidade celulolítica testada. Após 192 h de ensaio, o ensaio com melhores resultados apresentou uma remoção de 31,9% de celulose. Desta forma, o presente estudo indica que os resultados obtidos são comparáveis e a microbiota autóctone presente nos bagaços A, C, D e E é ainda mais propícia para solubilização ou biodegradação de celulose.

De acordo com as respostas alcançadas sobre o percentual de hemiceluloses nas amostras de BCA testadas, apenas a microbiota do reator E foi capaz de solubilizar ou degradar estes açúcares, ocorrendo uma queda de 35% durante o ensaio. Sobre os demais reatores, os índices não apresentaram diferença estatística quando se compara o início e fim do ensaio, ou seja, não houve remoção da fração de hemiceluloses presente nas biomassas analisadas durante o processo fermentativo. É provável que tal fato tenha ocorrido devido à predominância de organismos celulolíticos na microbiota autóctone, favorecendo a degradação e o consumo dos açúcares disponibilizados a partir da celulose.

Para o teor inicial de inorgânicos, as porcentagens identificadas nos bagaços brutos A (6,8%), B (6,2%), C (1,32%), D (3,2%), E (2,1%) e F (4,3%) estão de acordo com dados da literatura que indicam que os números podem variar de 1,3% a 9% (Al Arni *et al.*, 2010; Okolie *et al.*, 2020). E sobre o teor de extrativos, de acordo com Ingle *et al.*,

(2020), os valores são comuns entre 5% a 10% e os resultados obtidos variaram entre 4,4% e 9,1% nos seis reatores.

Tendo em vista a composição microbiológica e química das amostras de bagaço analisadas, percebe-se a nítida diferença nos teores de sua estrutura, bem como a maneira com que a microbiota autóctone variável afeta a degradação desta biomassa. Como discutido anteriormente, a composição (microbiológica e/ou química) de cada bagaço pode variar de acordo com a espécie de cana cultivada, região de cultivo, forma de processamento e armazenamento.

Os bagaços A e D, por exemplo, são da mesma usina (Santo Ângelo – Pirajuba/MG) alterando apenas a safra referente, sendo a primeira de 2019/2020 e a segunda de 2021/2022. E, por mais que ambas tenham apresentado taxas próximas de remoção de lignina (27,9% em A e 35% em D) e de celulose (49,2% em A e 53% em B), os microrganismos responsáveis por esta alteração claramente são de grupos diferentes visto a diferença da microbiota autóctone nestes reatores, a qual foi discutida na seção anterior (Seção 7.2).

7.5 Metabólitos produzidos durante a fermentação do BCA

Como descrito anteriormente na metodologia, durante a leitura da fração líquida por CLAE, os teores de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) também seriam quantificados ao longo do ensaio de fermentação, porém, os picos referentes aos açúcares co-eluíram com o pico de fosfato, devido à presença deste composto no meio de cultivo utilizado nos reatores ($K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ + extrato de levedura comercial). Desta forma, após diversas tentativas utilizando diferentes métodos de análise no cromatógrafo e o insucesso de todas elas, a maneira que analisaremos os teores de açúcares e seus respectivos consumos será exclusivamente pela caracterização química do BCA, como discuto na seção anterior (Seção 7.3).

Para análise dos metabólitos produzidos, foram retiradas 11 amostras nos tempos estipulados durante o processo fermentativo. Na Figura 21 são apresentados os gráficos gerados a partir dos bioprodutos obtidos, em g/L, a partir da fermentação dos seis bagaços analisados no decorrer das 408 h de ensaio (17 dias).

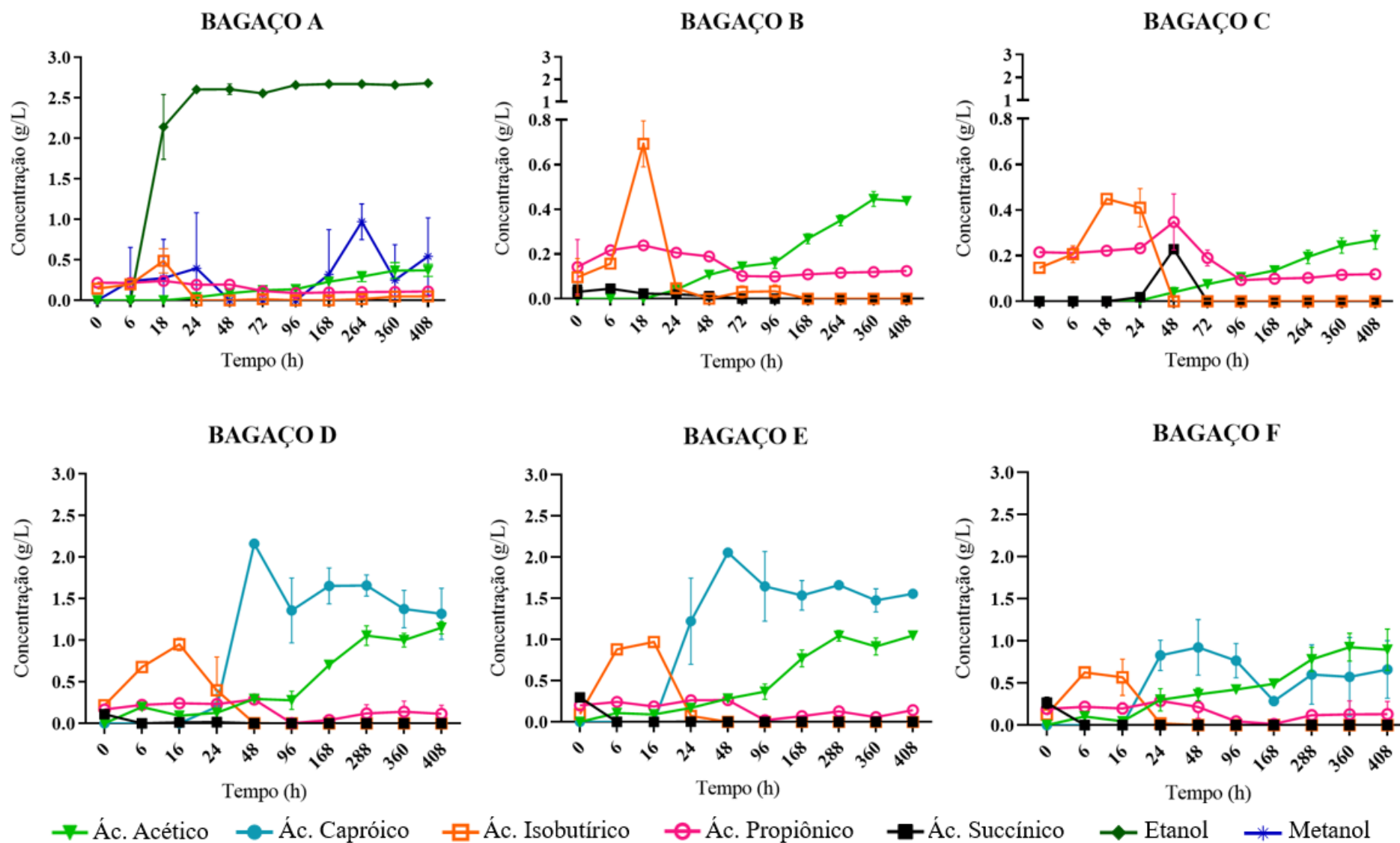


Figura 21. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir da fração líquida das seis amostras de BCA no decorrer da fermentação.

Preliminarmente, serão discutidas as particularidades dos reatores e, em seguida, o comportamento metabólico prevalecente nos mesmos, uma vez que houve semelhanças entre os produtos obtidos durante a fermentação.

A começar pelo reator A, o único produtor de etanol e metanol. Percebe-se que entre 6 e 24 h de experimento houve uma crescente produção de etanol que se manteve até o final do ensaio, alcançando o valor máximo de 2,68 g/L de etanol no tempo 408 h. A fermentação alcoólica pode ter sido favorecida por diversos microrganismos identificados no reator e este é um ótimo indicativo de que o bioprocessamento consolidado apresentado nesse trabalho é aplicável para a produção de etanol de segunda geração.

Presentes no início do ensaio, *Weissella* (1,36%) são heterofermentativas com capacidade de produzir etanol e ácido acético (Björkroth *et al.*, 2015). E no decorrer do experimento, o ambiente se tornou mais propício para cultivo de outros grupos produtores de etanol. De acordo com o resultado da caracterização metagenômica e estudo do metabolismo dos organismos com base na literatura, no tempo 96 h, os gêneros *Bacillus* (4,9%), *Paenibacillus* (12,2%), *Clostridium* (7,6%), *Lachnoclostridium* (33,6%), *Peptoclostridium* (6,3%) e *Ruminiclostridium* (1,4%) podem estar relacionados com a produção de etanol (Tran *et al.*, 2010; Jessen *et al.*, 2015; Wu e Cheng, 2021).

No trabalho de Soares e colaboradores (2020), para digestão anaeróbia do BCA pré-tratado hidrotermicamente, os pesquisadores apostaram na microbiota isolada do solo e resíduos de compostagem, para produzir etanol e hidrogênio. A maior produção alcançada foi de 0,02 g/L de etanol utilizando 3 g/L de BCA e quando aumentada a concentração do substrato, os autores relataram queda na concentração de etanol, alegando uma provável sensibilidade a elevadas concentrações de BCA pelo consórcio microbiano.

Liu e colaboradores (2020), ao investigar o bioprocessamento consolidado por *Clostridium thermocellum* obtiveram a produção máxima de etanol de 0,41 g/L, e na tentativa de otimização do bioprocessamento, esse foi refeito utilizando o BCA após pré-tratamento alcalino e a produção de etanol aumentou para 0,68 g/L. Também estudando a produção de etanol através do bioprocessamento consolidado, Singh e colaboradores (2019) investigando a fermentação do BCA por *Ruminiclostridium thermocellum*, conseguiram uma produção máxima de 1,95 g/L de etanol, confirmando o potencial de conversão da biomassa em bioetanol por esta cepa, atingindo uma taxa de degradação do BCA de 53,8%. Desta maneira, tendo como base os resultados obtidos por esses trabalhos, o presente estudo se mostra aplicável a processos posteriores de otimização da capacidade

de produção de etanol pela microbiota autóctone do bagaço A, a qual registrou acúmulo de etanol satisfatório (2,68 g/L) quando comparado a pesquisas similares e expondo como vantagem a ausência da etapa de pré-tratamento e considerável remoção das frações de lignina (27,9%) e de celulose (49,2%).

Muito tem se buscado sobre o aprimoramento de técnicas de produção do etanol celulósico, ou etanol de segunda geração (2G), em todo o mundo. Diversos métodos de pré-tratamento, visando maior rendimento, são testados e desenvolvidos constantemente (Bello *et al.*, 2018). Portanto, alcançar uma produção considerável de etanol por meio do bioprocessamento consolidado é essencial para reafirmar a possibilidade de fermentação do BCA bruto, bem como apostar na capacidade hidrolítica e fermentativa da microbiota presente na biomassa lignocelulósica.

Ainda sobre as exclusividades do bagaço A, o pico de produção de metanol (0,97 g/L) no tempo 264 h indica que, neste momento, havia bactérias ativas gerando o bioproduto, afirmando a possibilidade de que os produtos quantificados ao final do ensaio podem ter sido produzidos naquele período e não apenas acumulados durante a fermentação. Deste modo, a hipótese de que o consórcio microbiano presente no tempo 408 h seja esporos das espécies correspondentes, deixa de ser completamente concreta ao visualizar a obtenção de metanol, etanol e ácido acético crescente e/ou constante na etapa final do ensaio.

O metanol ou álcool metílico abrange uma ampla gama de aplicações industriais e é considerado um combustível limpo. Devido aos elevados custos das reações termoquímicas catalíticas para produção industrial deste composto, apostar em processos biológicos é uma alternativa interessante. Uma possibilidade de produção de biometanol é por meio da oxidação do metano gerado em reatores anaeróbios, impulsionada por enzimas específicas do metabolismo de organismos como *Methylobacterium alcaliphilum*, *Methylosinus trichosporium* e *Methylococcus capsulatus* (Salehi e Chaiprapat, 2021). No entanto, este substrato não estava disponível nos ensaios, sendo possível a obtenção de metanol por rotas alternativas, como por exemplo, a partir da pectina presente no tecido vegetal. Cepas pectinolíticas, como as do gênero *Clostridium*, produzem metanol como principal produto final durante o crescimento em pectina (Schink and Zeikus, 1980). Tendo em vista as vantagens de produção do metanol, alguns estudos vêm analisando as possibilidades de uma biorrefinaria combinada de etanol e metanol, uma configuração com elevada eficiência energética, sendo quase duas vezes superior a usinas tradicionais de etanol a partir da cana-de-açúcar (Albarelli *et al.*, 2014).

Assim sendo, a microbiota autóctone do bagaço A, neste ensaio, incluiu microrganismos produtores de metanol, os quais não foram identificados na caracterização metagenômica, reafirmando o elevado valor agregado dos bioprodutos obtidos durante a fermentação desta amostra.

O ácido capróico, produzido pela microbiota dos reatores D, E e F, começou a se acumular com 16 h de fermentação nos três reatores e atingiu a produção máxima no tempo de 48 h, sendo de 2,16 g/L em D, 2,05 g/L em E e 0,92 g/L em F neste momento. Posterior a isso, no decorrer da fermentação, houve uma queda nas concentrações de ácido capróico, porém, constantes até o final do ensaio, terminando com uma concentração de 1,31 g/L em D, 1,55 g/L em E e em 0,66 g/L em F. Isso indica que a produção de ácido continuou acumulada ou constante até o final do ensaio.

Usualmente o ácido capróico é obtido a partir de processo petroquímico, porém, outra maneira de se obtê-lo é a partir da fermentação de substratos biodegradáveis. Neste processo biológico, o ácido capróico, um ácido carboxílico de cadeia média (6 a 12 carbonos), é o produto de uma fermentação secundária que utiliza etanol ou ácido láctico como doador de elétrons em um processo de alongamento de cadeia carboxílica, também conhecido como β -oxidação reversa. Esta é uma reação de oxirredução onde o composto orgânico mais reduzido (etanol ou ácido láctico) doa elétrons para o composto orgânico mais oxidado (ácido acético ou ácido butírico) dando origem ao ácido capróico (Cavalcante *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2023). Dentre suas possíveis aplicações na indústria estão o uso como antimicrobiano na indústria farmacêutica, aditivo em ração animal, aditivo aromatizante em indústria alimentícia, matéria-prima na indústria química e um possível precursor na produção de biocombustíveis (Cavalcante *et al.*, 2017).

Sabendo disto, o ácido capróico obtido nos reatores D, E e F provavelmente é oriundo do uso direto do etanol e/ou ácido láctico (não detectados no ensaio), juntamente com o ácido isobutírico e/ou acético, indicando uma conversão direta em ácido capróico. Percebe-se que nos três reatores quando a obtenção do ácido capróico começa a decair gradativamente (168 h) a de ácido acético se torna crescente. Isto pode ter ocorrido pois o ácido acético, receptor de elétrons para alongamento da cadeia carboxílica na produção de ácido capróico, parou de ser convertido em ácido capróico, por falta de etanol e/ou ácido láctico, e passou a se acumular no final da fermentação. A produção de ácido capróico por bactérias dos gêneros *Clostridium* (identificado nos bagaços D, E e F) e *Rummeliibacillus* (identificado no bagaço E) é constantemente estudada e estes grupos

podem ser os responsáveis pela obtenção do mesmo no presente estudo (Hu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2022).

A produção de ácido succínico, que não ocorreu no reator A, foi maior em C com um pico de produção (0,22 g/L) no tempo 48 h. Nos reatores B, D, E e F a pequena concentração de ácido succínico detectada no início do experimento foi rapidamente consumida nas 6 primeiras horas de ensaio. O ácido succínico é um precursor do Poli (succinato de etileno) amplamente utilizado como material básico na indústria de plástico. Sua produção a partir do material lignocelulósico vem sendo cada vez mais aprimorada, porém a necessidade da onerosa etapa de hidrólise enzimática é um grande empecilho da produção em larga escala. Desta forma, apostar em bioprocessos consolidados para produção de ácido succínico passa a ser um caminho economicamente vantajoso (Lu *et al.*, 2021).

O trabalho de Rabelo *et al.*, (2018) investigou a capacidade de microrganismos, incluindo a microbiota autóctone do BCA, em converter a biomassa em hidrogênio e ácidos orgânicos. Após o teste de algumas condições, os autores obtiveram a produção de 1,57 g/L de ácido acético e 1,88 g/L de ácido succínico. As bactérias autóctones identificadas foram dos gêneros *Clostridium* e *Paenibacillus* e foram notadas mudanças significativas do consórcio microbiano de acordo com a troca das condições de fermentação. Ao utilizar o bagaço a 5 g/L em pH 6, os grupos identificados foram *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Enterobacter*. Todos os gêneros em questão foram identificados nos reatores B, C, D, E e/ou F do presente estudo, explicando a comum produção de ácidos por bactérias endógenas do BCA.

No que diz respeito às maiores semelhanças da fermentação do BCA, os metabólitos obtidos em todos os seis reatores são: ácido isobutírico, ácido propiônico e ácido acético. O comportamento destes metabólitos foi similar durante a fermentação com uma crescente produção de ácido isobutírico nas primeiras 16 h, alcançando uma concentração máxima de 0,97 g/L no reator E e total consumo ou degradação do mesmo até as 48 h de ensaio em todos os reatores. Supõe-se que a microbiota presente nos reatores é capaz de degradar o ácido isobutírico nestes primeiros dois dias de ensaio. Já a produção de ácido propiônico se manteve presente e, muitas vezes constante, até o final da fermentação dos seis reatores. A maior concentração obtida foi no reator C (0,34 g/L) após 48 h de experimento.

Sobre a obtenção de ácido acético, mencionada brevemente acima, esta começou a ser crescente com 48 h de fermentação nos seis reatores, apresentando concentrações

ainda mais favoráveis no tempo de 168 h até o final do experimento. A obtenção máxima do metabólito foi justamente após as 408 h de ensaio no reator do bagaço D (1,15 g/L). A produção de ácidos orgânicos já é esperada neste cenário, uma vez que, a microbiota autóctone do BCA é composta por diversas bactérias acetogênicas e acidogênicas. Por mais que o início do ensaio, para os reatores que foram analisados neste momento, seja marcado principalmente pela presença do gênero *Acetobacter*, o acúmulo de ácido acético nos reatores foi crescente do meio para o fim do ensaio. Outros gêneros acetogênicos que podem ter contribuído para esta produção também foram identificados no decorrer do ensaio, como por exemplo, *Sporomusa*, *Ruminiclostridium*, *Clostridium* e *Anaespora*.

A obtenção de ácidos orgânicos também foi relatada no estudo de Menegatto (2019), ao fermentar o BCA bruto utilizando microrganismos endógenos como inóculo, com uma produção de 1,3 g/L de ácido acético e 0,2 mg/L de ácido isobutírico. No trabalho de Soares *et al.*, (2019) a produção de ácido acético foi de 0,11 g/L e de ácido propiônico foi de 0,04 g/L na fermentação do BCA por bactérias isoladas do lodo de um reator UASB. Já durante a pesquisa de Cheng e Zhu (2013), foi avaliada a degradação do BCA bruto por *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacterium aotearoense* e com 72 h de fermentação obtiveram uma produção de 0,84 g/L de ácido acético.

Para melhor visualização dos resultados, na Tabela 9 são apresentadas as concentrações máximas acumuladas dos metabólitos obtidos durante a fermentação do BCA, sendo que os resultados que merecem maior destaque são: a produção de etanol no bagaço A, seguida da produção de ácido caproico no reator do bagaço D. Como salientado anteriormente, todos estes bioprodutos apresentam valor agregado para a indústria com aplicações em diversas áreas. E, tal como exposto, com base na literatura, os teores obtidos de cada metabólito são bastante similares e muitas vezes ultrapassam os rendimentos dos trabalhos consultados, uma vez que, refere-se à um bioprocessamento consolidado sem etapas de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e sequer controle da microbiota presente.

Tabela 10. Concentração máxima dos metabólitos obtidos durante a fermentação do BCA.

Metabólito	Concentração máxima (g/L)	Tempo (h)	Amostra BCA
Etanol	2,68	408	A
Ác. Capróico	2,16	48	D
Ác. Acético	1,15	408	D
Ác. Isobutírico	0,97	16	E
Metanol	0,97	264	A
Ác. Propiônico	0,34	48	C
Ác. Succínico	0,22	48	C

Sendo assim, a obtenção de bioprodutos oriunda da fermentação do BCA pode ser considerada um dos pilares da plataforma de derivados químicos a partir de recursos renováveis, contribuindo para uma tecnologia verde e conferindo ainda mais valor a estes compostos. Com base nos resultados obtidos, a otimização do processo, visando o aumento de rendimento e da escala de produção, é o principal objetivo para desenvolvimento de pesquisas posteriores de nosso grupo.

7.6 Fermentação bioaumentada do BCA (cultura isolada + microbiota autóctone)

Uma vez que as amostras de BCA são nomeadas por letras de A a F, os isolados selecionados para realização dos ensaios bioaumentados (A1, A2 e A3) foram, a partir deste momento, denominados X, Y e Z, respectivamente, para melhor entendimento. Na Tabela 11 é ilustrada a nova correspondência dos mesmos. Desta forma, as amostras dos bagaços D, E e F foram submetidas à fermentação pela sua microbiota autóctone acrescida dos isolados X, Y e Z (5% v/v), separadamente.

Tabela 11. Nomenclatura dos isolados destinados ao ensaio de fermentação bioaumentada.

(*) Probabilidade de pertencer a este gênero

Isolados (bagaço A)	Nomenclatura para ensaio bioaumentado	Gênero
A1	X	<i>Klebsiella</i>
A2	Y	<i>Bacillus</i>
A3	Z	<i>Sporomusa*</i>

Os ensaios de fermentação perduraram por 408 h e foram analisados quanto a sua microbiota autóctone no tempo 96 h, caracterização química da biomassa antes e após o experimento e produção de metabólitos, tendo como controle a fermentação dos bagaços sem a inoculação dos isolados.

7.6.1 Caracterização metagenômica da microbiota do bagaço de cana-de-açúcar

Na Figura 22 é apresentado o gráfico referente à caracterização da microbiota autóctone, realizada com 96 h de fermentação, dos bagaços D, E e F bioaumentados pelos isolados X, Y e Z.

Abundância Relativa (GÊNERO) - Ensaios Bioaumentados

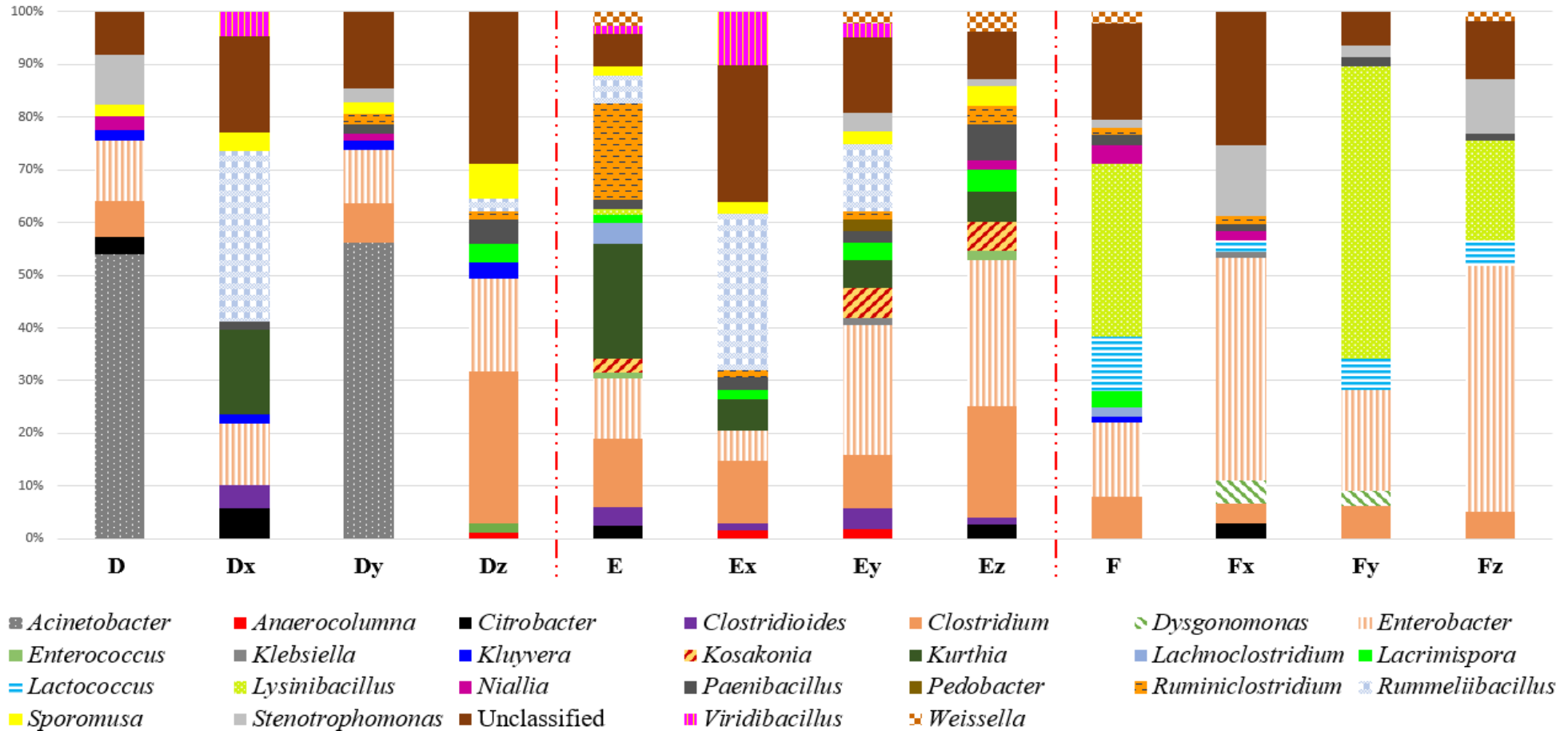


Figura 22. Gráfico da abundância relativa em nível de gênero da microbiota autóctone dos bagaços D, E e F em ensaios bioaumentados pelos isolados X (*Klebsiella*), Y (*Bacillus*) e Z (*Sporomusa*) com 96 h de fermentação.

Percebe-se que, quando comparado com o controle, sem bioaugmentação, os três bagaços apresentaram alteração da microbiota autóctone nos reatores durante a fermentação, quando as culturas isoladas foram inoculadas. Ora alguns microrganismos não foram mais detectados nos reatores bioaugmentados, ora cepas inéditas foram identificadas com 96 h de fermentação. Sendo assim, a inoculação das cepas selecionadas influenciou a proliferação de grupos bacterianos específicos, a qual pode ter sido direcionada pela nova configuração do meio, envolvendo competição metabólica, concentração de substrato e produtos acumulados.

Analisando as variáveis do bagaço D, dentre as três culturas inoculadas, a que menos influenciou a microbiota foi Y, classificada como *Bacillus*. Nota-se significativa semelhança entre Dy e o controle (D), principalmente quanto à presença do grupo *Acinetobacter* (50,1% em D e 52,8% em Dy), a qual não ocorreu em Dx e Dz. As poucas alterações que houve em Dy foram sutis, consistindo na exclusiva presença de *Ruminiclostridium* (1,9%) e *Paenibacillus* (1,6%) e na ausência de *Citrobacter* (3,0% em D).

Em contrapartida, o reator Dx, bioaugmentado por *Klebsiella*, foi marcado pela presença de grupos inéditos não identificados no controle, somando 56,4% de sua composição, sendo estes: *Rummeliibacillus* (30,9%), *Kurthia* (15,3%), *Viridibacillus* (4,5%), *Clostridioides* (4,3%) e *Paenibacillus* (1,4%). Desta forma, a inoculação desta cepa no reator D teve como consequência uma relevante modificação da microbiota após 96 h de fermentação. Tendo em vista que *Klebsiella* carrega características lignolíticas e capacidade de fermentar pentoses e hexoses resultando na obtenção de etanol, hidrogênio e ácidos, sua presença no início do ensaio pode contribuir para que a fermentação do BCA tenha melhores rendimentos (Melo-Nascimento *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022). Nas próximas seções serão apresentados os resultados do consumo de substrato e obtenção de metabólitos nos reatores contendo a cultura bioaugmentada para avaliar se a influência desta foi realmente promissora.

A respeito do reator Dz, as exclusividades identificadas consistem em 12,4% de sua composição em relação ao controle. Contudo, as maiores alterações foram na abundância relativa dos gêneros já identificados *Clostridium* e *Enterobacter*, por exemplo, elevaram seu percentual em 4 e 1,5 vezes, respectivamente, em Dz. Uma vez que estas são bactérias fermentadoras celulolíticas, o aumento de suas proliferações pode favorecer os rendimentos finais da fermentação (Varesche, 2015).

Sobre as mudanças acarretadas na microbiota do bagaço E, ao serem adicionados os isolados X, Y e Z, houve uma drástica redução dos grupos *Ruminiclostridium* e *Kurthia* nos três reatores bioaumentados. Já a abundância de *Enterobacter*, que consiste em 10,5% da microbiota autóctone do controle, foi favorecida nos reatores Ey e Ez, aumentando para 23,4% e 25,8%, respectivamente, nestes reatores. Outra alteração visível e significativa foi o aumento do grupo *Rummeliibacillus* em Ex (6 vezes maior) e em Ey (2,5 vezes maior). *Rummeliibacillus*, que também teve crescimento favorecido em Dx, é um gênero próximo ao *Bacillus* e intimamente relacionado com os gêneros *Kurthia* e *Viridibacillus*, sendo distinguidos por diferenças fenotípicas e de hibridização DNA-DNA. Deste modo, são bactérias gram-positivas, esporulantes e capazes de produzir ácidos a partir de diversas fontes de carbono, como por exemplo, glicose, xilose, arabinose, celobiose, etc. (Vaishampayan *et al.*, 2009).

Como discutido anteriormente, o gênero *Lysinibacillus* foi uma exclusividade do reator F, com abundância relativa de 30,1%. Em Fx o grupo não foi identificado, sendo diretamente afetado pela inoculação inicial de *Klebsiella*. Porém, para o reator Fy sua abundância aumentou para 52,2%, isto é, a presença aumentada de *Bacillus* no início do ensaio favoreceu esta proliferação. Já para o reator Fz a abundância relativa do gênero *Lysinibacillus* sofreu uma queda de 40%, compondo em 18% a microbiota identificada.

Ainda sobre as alterações que mais se destacaram em F, o gênero *Enterobacter* (13,1% em F) teve sua abundância relativa aumentada nos três reatores bioaumentados, passando para 40,4% em Fx, 18,0% em Fy e 44,6% em Fz. Os gêneros *Clostridium*, *Paenibacillus* e *Lactococcus* foram detectados nos quatro reatores em proporções similares e, com exclusividade, no reator Fx foi detectada a presença de *Klebsiella* (1,0%), a qual não havia ocorrido em Dx e Ex, todos bioaumentados por este microrganismo.

Observando a influência individual das culturas isoladas sobre cada bagaço, percebe-se que estas não seguiram o mesmo critério. Ao observar os reatores com o isolado X, por exemplo, para cada bagaço a microbiota identificada tendenciou à proliferação de grupos distintos. Isso pode ser justificado pela variação do consórcio microbiano natural de cada amostra. Desta forma, a inoculação de uma bactéria, mesmo que concentrada, não é capaz de estabelecer ou estreitar a proliferação da mesma, devido à grande variação da microbiota autóctone entre as amostras de BCA.

7.6.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

Assim como no ensaio autóctone, sem inoculação, estes também foram analisados quanto à caracterização química do BCA antes (tempo 0 h) e após a fermentação (tempo 408 h) para análise da biodegradação e/ou solubilização de lignina, celulose e hemiceluloses. Desta forma, é possível investigar se os inóculos colaboraram com a desestruturação da biomassa e disponibilizaram açúcares quando comparados com o controle que, neste caso, são os dados da caracterização química dos respectivos bagaços sem inoculação. Na Figura 23 são apresentados gráficos da caracterização dos bagaços D, E e F sem inoculação (inicial e final) e bioaumentados (final X, Y e Z). Os níveis de lignina, celulose e hemiceluloses iniciais foram comparados com os finais para análise de diferença estatística (5% de significância).

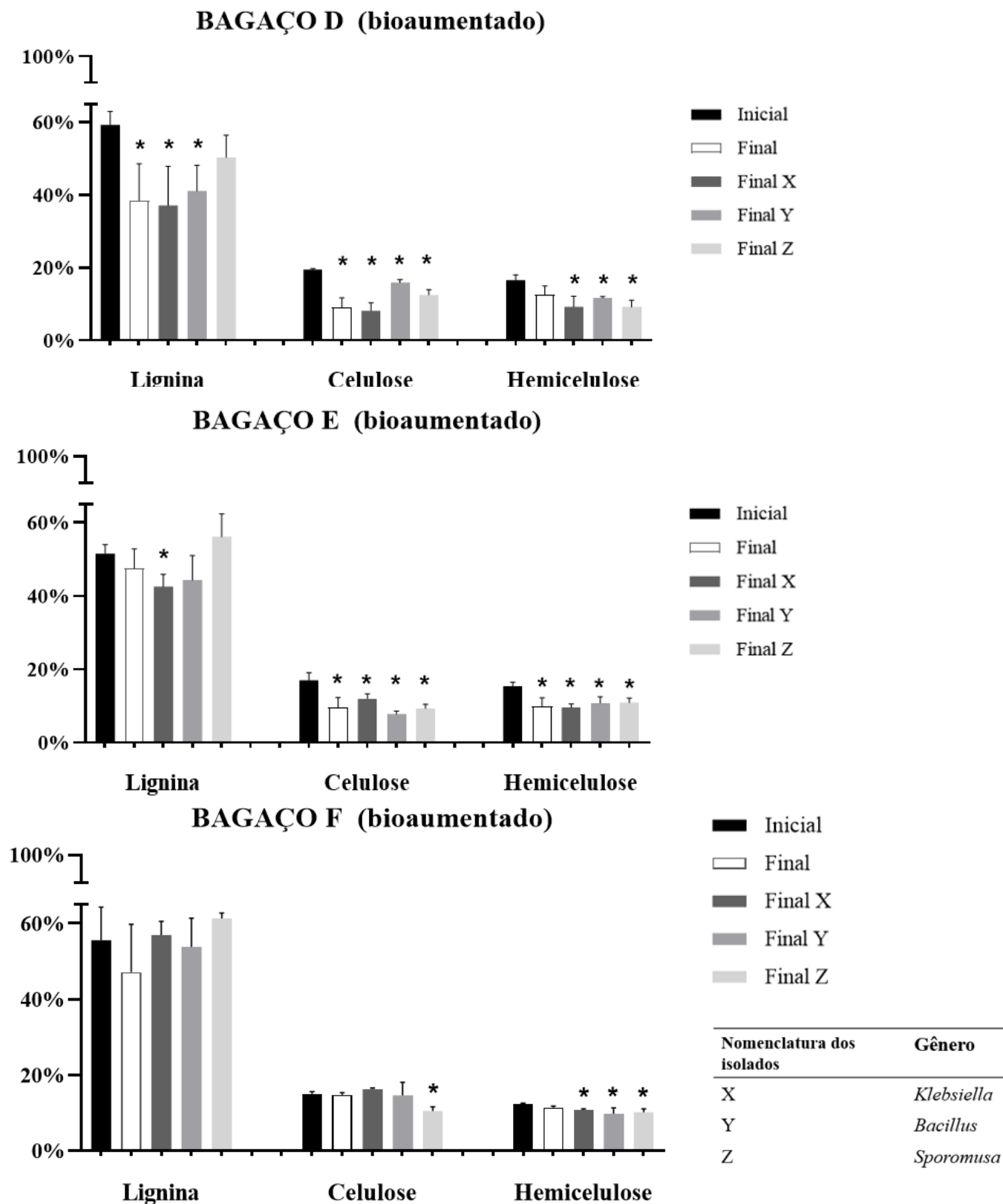


Figura 23. Gráficos da caracterização da estrutura química dos bagaços de cana-de-açúcar no início (0 h) e final (408 h) do ensaio de fermentação bioaumentado. O símbolo (*) indica diferença estatística entre o grupo indicado e o bagaço inicial ($p < 0,05$).

Para melhor visualização dos resultados, a Tabela 12 demonstra de outra maneira os dados apresentados na Figura 23, ou seja, a porcentagem, quando significativa, da remoção e/ou consumo de lignina, celulose e hemiceluloses durante os ensaios de fermentação bioaumentados. Quanto mais escuro os quadros da tabela, maior a remoção de lignina, celuloses ou hemiceluloses ocorrida.

Tabela 12. Resultado dos ensaios bioaumentados X (*Klebsiella*), Y (*Bacillus*) e Z (*Sporomusa*) comparados com o controle quanto a remoção de lignina (Lig), celulose (Cel) e hemiceluloses (Hemi) nos bagaços D, E e F durante a fermentação.

	Bagaço D			Bagaço E			Bagaço F			LEGENDA
	Lig	Cel	Hemi	Lig	Cel	Hemi	Lig	Cel	Hemi	
Controle	35 – 45%	45 – 55%	55 – 65%	55 – 65%	35 – 45%	35 – 45%	55 – 65%	55 – 65%	55 – 65%	
X	35 – 45%	45 – 55%	35 – 45%	10 – 25%	25 – 35%	35 – 45%	55 – 65%	55 – 65%	10 – 25%	
Y	25 – 35%	10 – 25%	25 – 35%	55 – 65%	45 – 55%	25 – 35%	55 – 65%	55 – 65%	10 – 25%	
Z	55 – 65%	35 – 45%	35 – 45%	55 – 65%	35 – 45%	25 – 35%	55 – 65%	25 – 35%	10 – 25%	

Os blocos preenchidos indicam diferença estatística entre o grupo indicado e o bagaço inicial (antes da fermentação) e os pontilhados não apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$).

Ao observar os resultados do bagaço D, a microbiota de Dx e Dy, assim como o controle, foi capaz de minimizar a porcentagem de lignina presente na biomassa, ou seja, a inoculação por *Klebsiella* e *Bacillus* no início do ensaio fez com que o consórcio microbiano sofresse alteração, porém, a remoção de lignina permaneceu similar ao controle, sem diferença estatística. Em contrapartida, para o reator Dz a alteração causada não foi favorável, uma vez que a porcentagem de lignina não variou ao longo do experimento. Quanto aos níveis de celulose presente no bagaço, nos quatro reatores houve solubilização e/ou biodegradação da mesma, o rendimento mais promissor foi em Dx, com uma queda no percentual de celulose de 58%. E resultados inéditos foram alcançados quanto aos níveis de hemiceluloses do bagaço D, a microbiota do bagaço bruto não foi capaz de modificar a quantidade destes açúcares e nos três reatores bioaumentados isto ocorreu, sendo que a porcentagem de hemiceluloses decaiu em 44% nos reatores Dx e Dz e 29% em Dy. Assim sendo, os reatores bioaumentados foram mais favoráveis que o controle quanto à biodegradação e/ou solubilização de hemiceluloses, mantiveram os

resultados referentes à celulose e para remoção de lignina apenas Dz não apresentou resultado vantajoso.

A respeito do bagaço E, apenas a inoculação por *Klebsiella* (reator Ex) foi vantajosa para a remoção de lignina da biomassa (17%), os demais, incluindo o controle, não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados com o bagaço bruto antes da fermentação. A queda de celulose e hemiceluloses ocorreu no reator controle e permaneceu estatisticamente igual em Ex, Ey e Ez, sem destaque positivo. Desta forma, o consórcio microbiano presente no reator Ex se destaca dentre os demais uma vez que este foi o único capaz de alterar, de maneira simultânea, os níveis de lignina, celulose e hemiceluloses do bagaço E.

Em relação ao bagaço F, nenhum reator apresentou remoção de lignina, e quanto aos níveis de celulose apenas em Fz houve remoção (30%), se destacando em relação ao controle. Assim como aconteceu nos reatores do bagaço D, todos os ensaios bioaumentados superaram o controle e foram eficazes na biodegradação e/ou solubilização de hemiceluloses, sendo registrada uma queda de 13% em Fx, 21% em Fy e 18% em Fz. Para melhor visualização dos resultados, a Tabela 12 indica resultados com diferença estatística na remoção e/ou consumo de lignina, celulose e hemiceluloses, quando comparado com o bagaço inicial (antes da fermentação) ($p < 0,05$).

Desta maneira, percebe-se que os ensaios bioaumentados foram favoráveis para a remoção de hemiceluloses em todas as amostras de BCA, se destacando em relação ao controle nos bagaços D e F. Os ensaios inoculados com as culturas X e Y foram capazes de diminuir o percentual de lignina, celulose e hemiceluloses do bagaço D. E o reator bioaumentado com a cepa X continuou com bom desempenho no bagaço E, sendo o único capaz de degradar a lignina presente nesta amostra. O ensaio bioaumentado com o isolado Z se destacou pela remoção de celulose em todas as amostras de BCA, sendo o único capaz de fazê-la no bagaço F.

Assim sendo, de maneira geral, os ensaios bioaumentados contribuíram com a desestruturação da biomassa lignocelulósica e a disponibilização dos açúcares, porém, não é possível atribuir grupos bacterianos responsáveis por este feito, uma vez que a microbiota autóctone do BCA é variável e não foram encontradas correlações entre os resultados obtidos e gêneros identificados nas amostras. A inoculação por *Klebsiella* (X) foi a condição que mais colaborou com a ruptura estrutural da biomassa, quando comparada ao controle e reatores de Y e Z, e o bagaço D foi o mais acessado pelas

microbiotas nas condições propostas. Desta forma, o reator Dx apresentou os melhores resultados quanto à remoção de lignina, celulose e hemiceluloses.

7.6.3 Metabólitos produzidos durante a fermentação do BCA

A produção de metabólitos obtida durante a fermentação bioaumentada dos bagaços D, E e F está apresentada a seguir na Figura 24. Assim como no ensaio autóctone do BCA bruto (sem inoculação das cepas X, Y e Z), surpreendentemente, os bioaumentados seguiram o mesmo comportamento na obtenção dos bioprodutos, por mais que a microbiota identificada nestes reatores e a caracterização química dos mesmos sejam estatisticamente distintas. Por se tratar de cepas com alta capacidade de fermentação, esperava-se produção de etanol nos ensaios bioaumentados por *Klebsiella*, obtenção de ácido láctico por *Bacillus* e 2,3-butanodiol em todos os três ensaios bioaumentados, uma vez que este é um produto em comum entre *Klebsiella*, *Bacillus* e *Sporomusa*. Os metabólitos obtidos em todas as condições propostas foram ácido acético, ácido caproico, ácido isobutírico, ácido propiônico e ácido succínico.

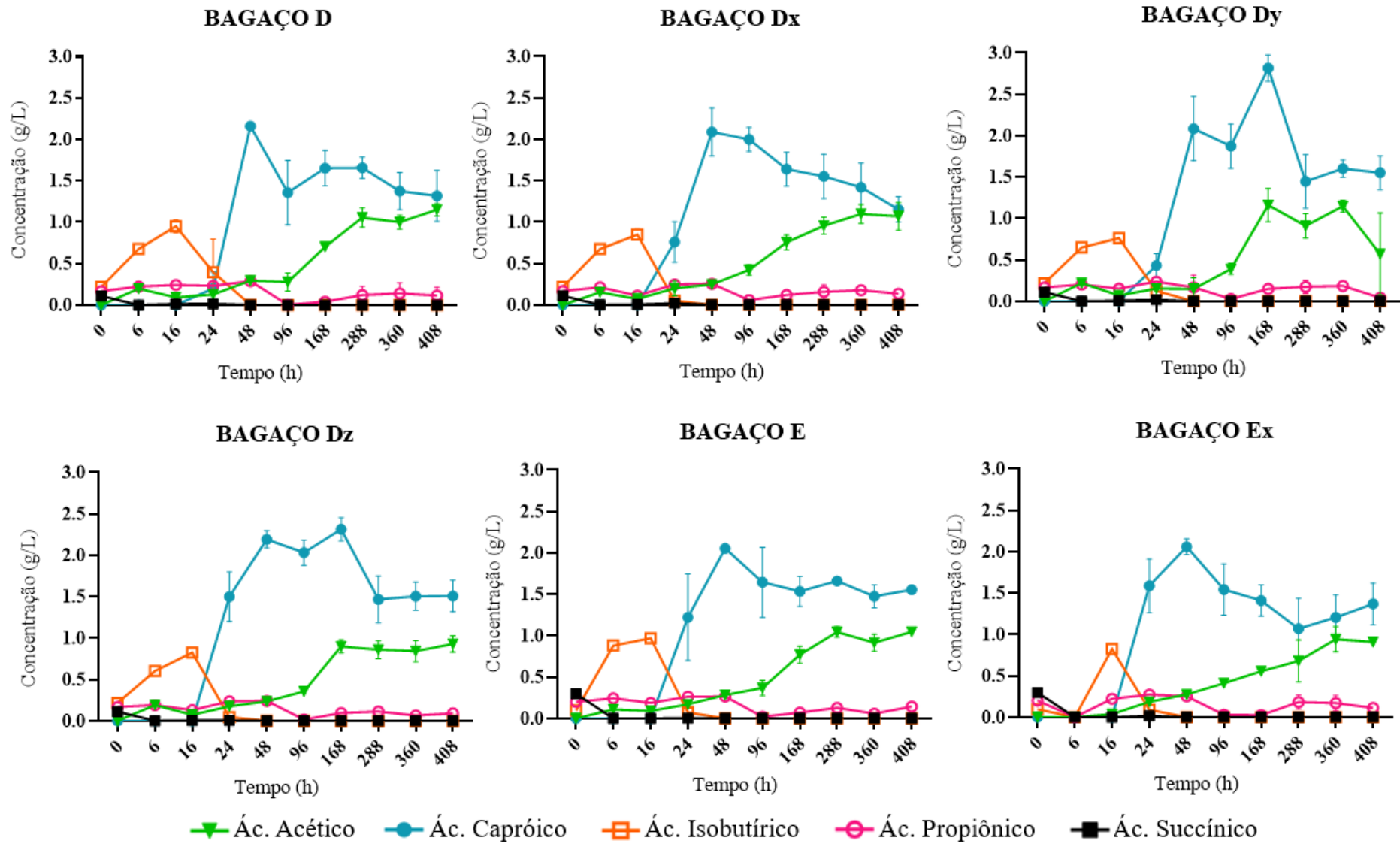


Figura 24. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir da fração líquida das amostras de BCA (A, B, C, D, E e F) no decorrer da fermentação bioaumentada pelos isolados X (*Klebsiella*), Y (*Bacillus*) e Z (*Sporomusa*).

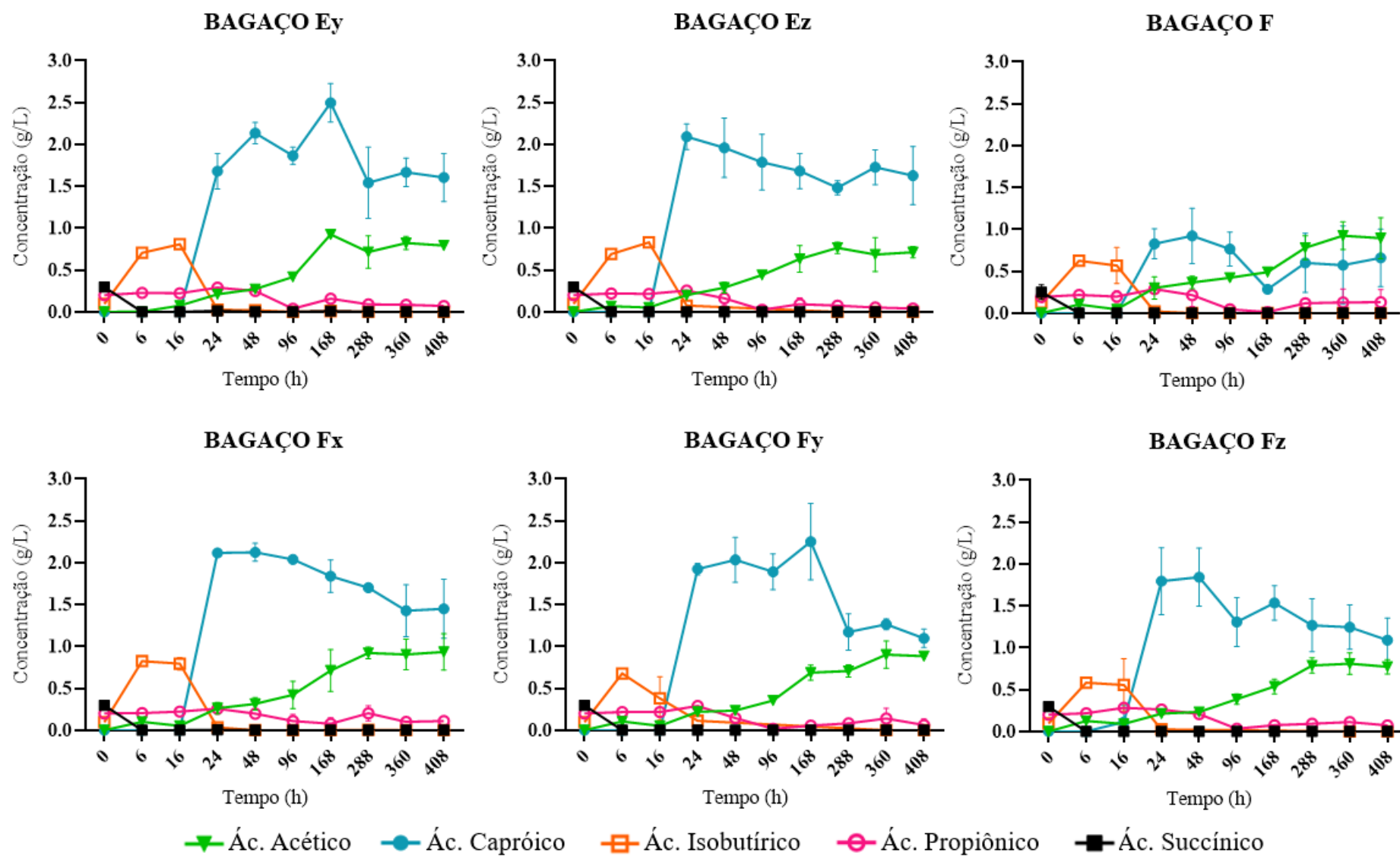


Figura 24. Produção dos metabólitos (g/L) analisados a partir da fração líquida das amostras de BCA (A, B, C, D, E e F) no decorrer da fermentação bioaugmentada pelos isolados X (*Klebsiella*), Y (*Bacillus*) e Z (*Sporomusa*).

Assim como discutido na Seção 7.4, a fermentação consiste no rápido consumo do ácido succínico inicial até as 6 h de ensaio. A obtenção do ácido isobutírico é crescente nas primeiras 16 h de experimento e após 48 h foi completamente consumido nos reatores. As maiores concentrações obtidas de ácido isobutírico foram de 0,97 g/L em E e 0,95 g/L em D, ambos com 16 h de fermentação. Sobre a produção de ácido propiônico, este se manteve presente em baixas concentrações e muitas vezes constante até o final do ensaio, o maior rendimento foi de 0,29 g/L com 24 h de ensaio nos reatores Ey e Fy, ambos sem diferença estatística em relação aos seus respectivos controles E e F.

Em todas as condições propostas, os metabólitos obtidos em maior concentração foram os ácidos acético e caproico. A produção de ácido acético passa a ser crescente a partir de 48 h de fermentação e permanece até o fim do ensaio, com exceção do reator Dy o qual apresentou uma queda na produção nas horas finais. O reator responsável pela maior concentração de ácido acético continua sendo D (1,15 g/L) com 408 h. E, por fim, a obtenção de ácido caproico inicia-se após 16 h de fermentação nos reatores e a produção recorde foi em Dy (2,81 g/L) e Ey (2,49 g/L), ambos no tempo 168 h. Vale a pena ressaltar que a produção de ácido caproico nos reatores F bioaumentados superou o controle. A concentração máxima obtida em F foi de 0,92 g/L e os bioaumentados alcançaram 2,12 g/L em Fx, 2,25 g/L em Fy e 1,84 g/L em Fz.

A crescente produção de ácido acético após 48 h e consumo do ácido isobutírico nos primeiros dias de experimento também foi registrada no trabalho de Menegatto (2019). Ao fermentar o bagaço de cana bruto pela sua microbiota autóctone, obteve-se a produção máxima de ácido acético de 1,3 g/L ao final de 198 h de fermentação. Já a produção máxima de ácido isobutírico foi próxima de 0,5 g/L no tempo 50 h e antes de completar 75 h ele foi completamente consumido. O mesmo comportamento se estende aos ensaios bioaumentados realizados por Menegatto (2019), confirmando assim, que o desempenho na produção destes ácidos é habitual e resiliente na fermentação do BCA bruto por sua microbiota autóctone, independente da origem da amostra. O melhor resultado do estudo citado foi a produção de ácido acético comentada e o presente estudo apresentou uma produção equivalente (1,15 g/L). Já para a produção de ácido isobutírico (0,97 g/L) o presente estudo superou o trabalho de Menegatto (2019).

É válido ressaltar que ácidos acumulados durante a fermentação do BCA, principalmente ácido acético, têm influência inibitória na formação de etanol, desta maneira, a majoritária presença de organismos acetogênicos nos reatores pode ter

favorecido a obtenção deste ácido, afetando diretamente a possível produção de etanol nos reatores (Liu *et al.*, 2020).

O maior objetivo dos ensaios bioaumentados, além da investigação de microrganismos lignocelulolíticos, é a obtenção de bioprodutos de valor agregado em rendimentos inéditos. Todos os produtos obtidos durante a fermentação apresentam bons rendimentos quando comparados com a literatura e são de relevante interesse industrial, porém, quando bioaumentados por *Klebsiella*, *Bacillus* e possível cepa do gênero *Sporomusa*, as concentrações obtidas não se sobressaíram em relação ao controle, com exceção do ácido caproico. Sendo assim, conclui-se que para a obtenção de bioprodutos, nas condições estabelecidas, a fermentação bioaumentada não contribuiu com produtos inéditos de fermentação. Portanto, também não foi interferida negativamente, uma vez que, todos os metabólitos obtidos nos ensaios controle foram equivalentemente quantificados nos ensaios bioaumentados.

Desta maneira, os ensaios bioaumentados foram responsáveis pela formação de um consórcio microbiano produtor de enzimas lignocelulolíticas capazes de acessar a estrutura recalcitrante do BCA, uma vez que nestes ensaios a remoção de lignina, hemiceluloses e/ou celulose ultrapassou os valores obtidos no ensaio controle. Isto se deve aos resultados apresentados anteriormente. Uma vez que as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática são as mais onerosas do processo de utilização da biomassa lignocelulósica, os resultados demonstram ser promissores, sendo necessária uma futura inspeção das condições de experimento para que os resultados sejam satisfatórios quando aplicados a qualquer tipo de amostra de BCA, independente da origem, espécie e/ou forma de armazenamento. Sendo, então, possível a utilização destes microrganismos, em conjunto com a microbiota autóctone, na etapa de ruptura estrutural da biomassa e disponibilização dos açúcares disponíveis, contribuindo assim, com altos rendimentos dos produtos finais de fermentação.

Para visualização geral dos resultados obtidos nos experimentos realizados no presente estudo, seja ele em ensaios de fermentação com a microbiota autóctone do BCA bruto ou bioaumentado, a Tabela 13 exibe as maiores concentrações alcançadas.

Tabela 13. Rendimentos máximos obtidos durante o processo de fermentação do BCA envolvendo todas as condições testadas.

Metabólito	Concentração máxima (g/L)	Tempo (h)	Reator
Ác. Capróico	2,81	168	Dy
Etanol	2,68	408	A
Ác. Acético	1,15	408	D
Ác. Isobutírico	0,97	16	E
Metanol	0,97	264	A
Ác. Propiônico	0,34	48	C
Ác. Succínico	0,22	48	C

Componente estrutural	Taxa máxima de remoção (%)	Reator
Lignina	37,1	Dx
Celulose	58,0	Dx
Hemicelulose	44,5	Dx

Como discutido na Seção 7.4, ao apresentar os metabólitos obtidos durante a fermentação dos seis bagaços, o presente estudo foi promissor na obtenção de bioprodutos quando comparado com trabalhos similares disponíveis na literatura, uma vez que, trata-se de uma fermentação de baixo custo, utilizando como substrato o BCA bruto, sem etapas de pré-tratamento e/ou hidrólise enzimática. Isto significa que o bioprocessamento consolidado foi possível para a obtenção destes bioprodutos e a aposta na microbiota autóctone para realização do processo também se mostrou satisfatória, isto é, evidenciado não apenas com a produção de interessantes metabólitos, mas também, nas significativas remoções de lignina, celulose e hemiceluloses registradas. Tais resultados são evidenciados nos ensaios bioaumentados que contribuirão fortemente com o aumento das porcentagens de remoção destes componentes.

Elevados rendimentos na remoção de lignina e hemiceluloses aumentam a susceptibilidade das fibras da biomassa ao ataque enzimático e consequente consumo de celulose (Rahmati *et al.*, 2020). Ao passar por pré-tratamentos químicos ou físicos e hidrólise enzimática as porcentagens de remoção dos componentes estruturais podem ultrapassar 80% (Liu *et al.*, 2020). Visto que o presente estudo apostou em

microrganismos endógenos para realização destas etapas, opção evidentemente mais econômica, os rendimentos obtidos são eficazes e promissores. Como demonstrado, as maiores taxas de remoção dos constituintes do BCA ocorreram no reator Dx, com remoção de lignina de 37%, de celulose de 58% e de hemiceluloses de 44,5%. O trabalho de Menegatto (2019), como já citado, também testou a fermentação do BCA bruto por sua microbiota autóctone e bioaumentada, em 7 condições distintas, e alcançou a remoção máxima de celulose de 31,9% e hemiceluloses de 30,8%, e a remoção da fração de lignina não ocorreu em nenhuma circunstância. Tendo isto em vista, certifica-se os rendimentos inéditos obtidos no presente estudo.

Desta maneira, podemos afirmar que os ensaios bioaumentados foram favoráveis para o processo de hidrólise do BCA, confirmando a capacidade lignocelulolítica dos microrganismos endógenos beneficiados pela inoculação das cepas selecionadas, em destaque, os ensaios acrescidos por *Klebsiella pneumoniae* (isolado X).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi avaliada a estratégia de fermentação do BCA bruto por sua microbiota autóctone e bioaugmentada visando um bioprocesso consolidado para geração de produtos de valor agregado. Após fermentar seis bagaços de origens distintas e identificar as bactérias neles presentes, constatou-se que o consórcio microbiano dos reatores tem em comum a presença das classes Alphaproteobacteria, Clostridia, Bacilli, Gammaproteobacteria e Negativicutes.

A fração de lignina presente nos reatores com a microbiota endógena do BCA apresentou queda durante a fermentação dos bagaços A (27,9%), B (27,9%) e D (35%) e esses números foram superados nos ensaios bioaugmentados, com inédita remoção de lignina de 17,4% em Ex (a qual não ocorreu em seu controle) e rendimento máximo em Dx (37,1%). A respeito do percentual de celulose, as maiores remoções foram dos reatores bioaugmentados Dx (58%) e Ey (54%), confirmando a disponibilização dos açúcares na maioria das condições propostas. E remoção e/ou consumo de hemiceluloses dos BCA também foi favorecida pelos ensaios bioaugmentados uma vez que, quando fermentado exclusivamente com a microbiota autóctone, apenas o reator E apresentou remoção de 35,3%. E em todos os ensaios bioaugmentados houve remoção significativa de hemiceluloses. O melhor rendimento foi em Dx com uma queda deste percentual de 44,3% e no reator Dz de 44,2%. Confirmando assim, a elevada capacidade lignocelulolítica dos microrganismos autóctones do BCA.

Seguindo a ordem de melhores rendimentos, os produtos obtidos foram ácido caproico (2,81 g/L em Dy), etanol (2,68 g/L em A), ácido acético (1,15 g/L em D), ácido isobutírico (0,97 em E), metanol (0,97 g/L em A), ácido propiônico (0,34 g/L em C) e ácido succínico (0,22 g/L em C). De acordo com os rendimentos obtidos, conclui-se que a presença e atividade de microrganismos autóctones na fermentação do BCA é uma alternativa de bioprocesso consolidado, contribuindo com o conceito de biorrefinaria de maneira econômica e rentável, além de reafirmar a possibilidade de obtenção de produtos diferentes do etanol. Dessa forma, os resultados apresentados se mostram relevantes para o desenvolvimento de condições otimizadas de fermentação para melhor aproveitamento do BCA bruto e, conseqüentemente, maior concentração de produtos de valor comercial.

9. CONCLUSÃO

A obtenção de bioprodutos a partir da fermentação do BCA através do bioprocesso consolidado tem como maior empecilho a desestruturação da biomassa devido sua característica recalcitrante. Seis amostras de BCA de origem distinta foram submetidas à fermentação por sua microbiota autóctone e a maior remoção de lignina, celulose e hemiceluloses foi de 35% em D, 53% em C e D e 35% em E, respectivamente, confirmando a capacidade lignocelulolítica destes microrganismos. Estes números foram superados no ensaio do bagaço D bioaumentado por *Klebsiella pneumoniae* alcançando a remoção de 37% de lignina, 58% de celulose e 44% de hemiceluloses, demonstrando que este ensaio bioaumentado foi vantajoso em relação ao controle quanto à desestruturação do material lignocelulósico. Confirmando a capacidade fermentativa da microbiota autóctone, dentre os bioprodutos obtidos, as maiores concentrações alcançadas foram de ácido caproico (2,81 g/L em Dy), etanol (2,68 g/L em A) e ácido acético (1,15 g/L em D). Ao comparar a microbiota presente nas amostras de BCA percebe-se variação das espécies presentes, e bagaços da mesma origem e safras distintas apresentaram diferença, não só na microbiota, mas também nos produtos de fermentação obtidos. Assim sendo, conclui-se que é viável e promissora a obtenção de bioprodutos de elevado valor agregado, no entanto, devido à variação da composição química e microbiológica dos bagaços, os produtos gerados podem variar.

10. PERSPECTIVAS

Como percebido, diferenças entre a microbiota autóctone, consumo de substrato e obtenção de metabólitos foram registradas na fermentação das seis amostras de BCA, e por mais que estas sejam oriundas da mesma usina de álcool, como os bagaços A e D por exemplo, a simples mudança de safra é capaz de modificar a microbiota autóctone do BCA e, conseqüentemente, seus rendimentos finais de fermentação. Desta forma, para dar continuidade neste projeto, os passos futuros baseiam-se no estabelecimento de uma condição de bioaugmentação que seja resiliente a qualquer amostra de BCA, para que o bioprocessamento consolidado seja amplamente aplicado, independentemente da origem e microbiota presente no BCA. Um grande pilar desta proposta são os resultados alcançados pela inoculação por *Klebsiella pneumoniae*, a qual apresentou potencial lignocelulolítico em 77,7% das condições testadas. Uma vez que a desestruturação da estrutura recalcitrante do BCA é o maior empecilho ao utilizá-lo como substrato, otimizar o processo bioaugmentado por esta cepa pode fazer com que todos os ensaios inoculados pela mesma sofram ruptura e hidrólise do BCA, contribuindo assim para a disponibilização dos açúcares e, por conseguinte, obtenção de metabólitos de interesse.

Com o mesmo objetivo de otimização dos rendimentos, outra vertente é testar como substrato o BCA bruto adicionado de fontes de carbono de baixo custo, como por exemplo, farelo de trigo. Desta forma, no início do ensaio fermentativo, enquanto o BCA não é hidrolisado pela microbiota lignocelulolítica presente no reator, este substrato de fácil acesso já estará disponível e será rapidamente metabolizado por bactérias fermentativas presentes desde o primeiro momento do ensaio, aumentando os rendimentos dos metabólitos gerados.

11. BIBLIOGRAFIA

Aicha Asma Houfani, Nico Anders, Antje C. Spiess, Petr Baldrian, S. B. (2020) 'Biomass and Bioenergy Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars – a review', *Biomass and Bioenergy*, 134(February).

Albarelli, J. Q. *et al.* (2014) 'Thermo-economic optimisation of integrated ethanol and methanol production in the sugarcane industry', *Chemical Engineering Transactions*, 39(Special Issue), pp. 1741–1746. doi: 10.3303/CET1439291.

Alokika, Anu, Anil Kumar, Vinod Kumar, B. S. (2021) 'Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective', *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, pp. 564–582. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175.

Andreesen, J. R., Bahl, H. and Gottschalk, G. (1989) 'Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus *Clostridium*', in *Clostridia*. Boston, MA: Springer US, pp. 27–62. doi: 10.1007/978-1-4757-9718-3_2.

Al Arni, S., Bosio, B. and Arato, E. (2010) 'Syngas from sugarcane pyrolysis: An experimental study for fuel cell applications', *Renewable Energy*, 35(1), pp. 29–35. doi: 10.1016/j.renene.2009.07.005.

Assis, G. B. N. *et al.* (2017) 'Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens', *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). doi: 10.3389/fmicb.2017.01492.

Balk, M. *et al.* (2010) '(Per)chlorate reduction by an acetogenic bacterium, *Sporomusa* sp., isolated from an underground gas storage', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), pp. 595–603. doi: 10.1007/s00253-010-2788-8.

Banu, J. R. *et al.* (2021) 'Lignocellulosic biomass based biorefinery : A successful platform towards circular bioeconomy', *Fuel*, 302(May), p. 121086. doi: 10.1016/j.fuel.2021.121086.

Bao, P. and Li, G.-X. (2017) ‘Sulfur-Driven Iron Reduction Coupled to Anaerobic Ammonium Oxidation’, *Environmental Science & Technology*, 51(12), pp. 6691–6698. doi: 10.1021/acs.est.6b05971.

Barbosa, F. C., Silvello, M. A. and Goldbeck, R. (2020) ‘Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production’, *Biotechnology Letters*, 42(6), pp. 875–884. doi: 10.1007/s10529-020-02875-4.

Bello, S., Feijoo, G. and Compostela, S. De (2018) ‘Comparative evaluation of lignocellulosic biorefinery scenarios under a life-cycle assessment approach’, pp. 1–18. doi: 10.1002/bbb.1921.

Bertuci, M. L. (2021) *Produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de cascas de arroz por co- cultura de Saccharomyces cerevisiae e Pachysolen tannophilus immobilizadas em alginato de sódio*. Universidade Estadual Paulista.

Biebl, H. *et al.* (2000) ‘Propionispora vibrioides , nov. gen., nov. sp., a new gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols’, *Archives of Microbiology*, 174(4), pp. 239–247. doi: 10.1007/s002030000198.

Björkroth, J., Dicks, L. M. T. and Holzappel, W. H. (2015) ‘Weissella’, in *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp. 1–15. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00609.

Boonyuen, N. *et al.* (2014) ‘International Biodeterioration & Biodegradation Decomposition of sugarcane bagasse with lignocellulose-derived thermotolerant and thermoresistant Penicillia and Aspergilli’, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 92, pp. 86–100. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.04.013.

Borges, C. P. and Gigliolli, A. A. S. (2020) ‘Avaliação Do Acervo De Informações De Teores De Celulose, Hemicelulose E Lignina Na Biomassa Do Bagaço De Cana De Açúcar / Evaluation of the Information Collection of Cellulose, Hemicellulose and Lignin Contents in Sugarcane Bagasse Biomass’, *Brazilian Journal of Development*, 6(9), pp.

71782–71791. doi: 10.34117/bjdv6n9-574.

Brethauer, S., Shahab, R. L. and Studer, M. H. (2020) ‘Impacts of biofilms on the conversion of cellulose’, 1, pp. 5201–5212. doi: 10.1007/s00253-020-10595-y

Bright Akwasi Gyamfi, Steve Yaw Sarpong, M. A. B. (2020) ‘The contribution of the anthropogenic impact of biomass utilization on ecological degradation : revisiting the G7 economies’, p. 14. doi: 10.1007/s11356-020-11073-8.

Cao, S. and Aita, G. M. (2013) ‘Bioresource Technology Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse’, *Bioresource Technology*, 131, pp. 357–364. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.170.

Carlucci, F. V. *et al.* (2021) ‘Environmental, field and impurity factors to increase the agricultural performance of Brazilian and Australian sugarcane mills’, *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23(7), pp. 2083–2100. doi: 10.1007/s10098-021-02105-z.

Carpio, L. G. T. and Simone de Souza, F. (2017) ‘Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions’, *Renewable Energy*, 111, pp. 771–780. doi: 10.1016/j.renene.2017.05.015.

Cavalcante, W. A. *et al.* (2020) ‘Upgrading sugarcane biorefineries: Acetate addition allows for conversion of fermented sugarcane molasses into high-value medium chain carboxylic acids’, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(2), p. 103649. doi: 10.1016/j.jece.2019.103649.

Cavalcante, W. de A. *et al.* (2017) ‘Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review’, *Process Biochemistry*, 54, pp. 106–119. doi: 10.1016/j.procbio.2016.12.024.

Chandel, A. K., Albarelli, J. Q., Santos, D. T., Chundawat, S. P., Puri, M., & Meireles, M. A. A. (2019) ‘Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol bagasse at a commercial scale’, *BioFPR*, pp. 1–21. doi: 10.1002/bbb.1990.

Chandel, A. K. *et al.* (2018) 'The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization', *Bioresource Technology*, 264, pp. 370–381. doi: 10.1016/j.biortech.2018.06.004.

Chandra Raj, K., Ingram, L. and Maupin-Furlow, J. (2001) 'Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*', *Archives of Microbiology*, 176(6), pp. 443–451. doi: 10.1007/s002030100348.

Chen, H. (2014) *Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose*. Biotechnology of Lignocellulose. doi: 10.1007/978-94-007-6898-7.

Cheng, J. and Zhu, M. (2013) 'A novel anaerobic co-culture system for bio-hydrogen production from sugarcane bagasse', *Bioresource Technology*, 144, pp. 623–631. doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.018.

Christoff, A. P. *et al.* (2017) 'Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing', *Sequencing Neoprosecta Microbiome Technologies*, (May 2017). Available at: <http://neoprosecta.com>.

Clauser, N. M. *et al.* (2021) 'A framework for the design and analysis of integrated multi-product biorefineries from agricultural and forestry wastes', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 139(December 2020). doi: 10.1016/j.rser.2020.110687.

CONAB, C. N. de A.- (2019) 'Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar', 1.

CONAB, C. N. de A.- (2023) 'Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar', Segundo Levantamento, p 1–59.

Dam, T. T. (2021) *Development of new enzymes and microbial cells for the enhancement of livestock feeds based on sugarcane fibre*. Queensland University of Technology.

Devi, A. *et al.* (2021) 'Ethanol from lignocellulosic biomass : An in-depth analysis of pre-treatment methods , fermentation approaches and detoxification processes', *Journal of*

Environmental Chemical Engineering, 9(5), p. 105798. doi: 10.1016/j.jece.2021.105798.

Dionísio, S. R. *et al.* (2021) ‘Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse’, *Fuel*, 304(February), p. 121290. doi: 10.1016/j.fuel.2021.121290.

Dong, W. *et al.* (2023) ‘Caproic acid production from anaerobic fermentation of organic waste - Pathways and microbial perspective’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 175, p. 113181. doi: 10.1016/j.rser.2023.113181.

EPE (2021) ‘BEN 2021 Relatório Síntese’, pp. 1–73. Available at: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2021>.

Farmer, J. J., Farmer, M. K. and Holmes, B. (2010) ‘The Enterobacteriaceae: General Characteristics’, in *Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9780470688618.taw0051.

Gao, Y. *et al.* (2018) ‘Ethanol production from sugarcane bagasse by fed- - batch simultaneous saccharification and fermentation at high solids loading’, (October), pp. 810–818. doi: 10.1002/ese3.257.

Garza-Ramos, U. *et al.* (2018) ‘Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections’, *New Microbes and New Infections*, 23, pp. 17–27. doi: 10.1016/j.nmni.2018.02.002.

Gebbie, L. *et al.* (2020) ‘A snapshot of microbial diversity and function in an undisturbed sugarcane bagasse pile’, *BMC Biotechnology*, 20(1), p. 12. doi: 10.1186/s12896-020-00609-y.

George Jackson de Moraes Rocha, Viviane Marcos Nascimento, Adilson Roberto Gonçalves, Vinicius Fernandes Nunes Silva, C. M. (2015) ‘Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical – chemical composition’, 64, pp. 52–58. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.11.003.

Gomes, C. *et al.* (2019) 'Acetone -butanol -ethanol fermentation from sugarcane bagasse hydrolysates: utilization of C5 and C6 sugars', *Electronic Journal of Biotechnology*, 42. doi: 10.1016/j.ejbt.2019.10.004.

González-Leos, A. *et al.* (2020) 'Kinetics of lactic acid fermentation from sugarcane bagasse by *Lactobacillus Pentosus*', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(1), pp. 377–386. doi: 10.24275/rmiq/Alim618

Grajek, E. C. W. (2009) 'Biotechnological production of 2 , 3-butanediol — Current state and prospects', 27, pp. 715–725. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.002.

Guedes, J.M.; Santos, A. G. D.; Santos, H. S. (2021) 'Uso da biomassa como fonte energética para produção de biocombustíveis', *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, 1, pp. 75–83. doi: 10.24979/ambiente.v1i1.947.

Guragain, Y. N. and Vadlani, P. V (2017) '2 , 3-Butanediol production using *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 : Evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process', *Process Biochemistry*. doi: 10.1016/j.procbio.2017.05.001.

Gurgel, L. V. A. (2010) *Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana-de-Açúcar: Estudo Cinético de Sacarificação de Celulose para Produção de Etanol*. Universidade de São Paulo.

Habibi, Y., Lucia, L. A. and Rojas, O. J. (2010) 'Cellulose Nanocrystals : Chemistry , Self-Assembly , and Applications', d, pp. 3479–3500. doi: 10.1021/cr900339w

Hamann, P. R. V *et al.* (2021) 'Enzyme and Microbial Technology Assembling mini-xylanosomes with *Clostridium thermocellum* XynA , and their properties in lignocellulose deconstruction', *Enzyme and Microbial Technology*, 150(August), p. 109887. doi: 10.1016/j.enzmictec.2021.109887.

Hu, X., Du, H. and Xu, Y. (2015) 'Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production', *International Journal of Food Microbiology*, 214, pp. 116–122. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.032.

Huang, K. *et al.* (2017) 'Improving economics of lignocellulosic biofuels : An integrated strategy for coproducing 1,5-pentanediol and ethanol', *Applied Energy*, (November), pp. 585–594. doi: 10.1016/j.apenergy.2017.11.002.

Huang, Y. *et al.* (2019) 'Hyperthermophilic pretreatment composting significantly accelerates humic substances formation by regulating precursors production and microbial communities', *Waste Management*, 92, pp. 89–96. doi: 10.1016/j.wasman.2019.05.021.

Huda Sultan Al-Battashi, Neelamegam Annamalai, Nallusamy Sivakumar, Saif Al-Bahry, Bhumi Nath Tripathi, Quang D. Nguyen, V. K. G. (2019) 'Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production', *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4. doi: 10.1007/s11157-018-09488-4.

Ingle, A. P., Chandel, A. K., & Silva, S. S. (2020) *Lignocellulosic Biorefining Technologies*. John Wiley & Sons Ltd. doi: 10.1002/9781119568858.

Jessen, J. E. *et al.* (2015) 'Ethanol production by a *Paenibacillus* species isolated from an Icelandic hot spring – Production yields from complex biomass', *Icelandic Agricultural Sciences*, 28(1), pp. 15–24. doi: 10.16886/IAS.2015.02.

de Jesus Junior, M. M. *et al.* (2022) 'Economic Evaluation for Bioproducts Production from Carbohydrates Obtained from Hydrolysis of Sugarcane Bagasse', *Chemical Engineering Transactions*, 92(March), pp. 703–708. doi: 10.3303/CET2292118.

Kawagoshi, Y. *et al.* (2005) 'Effect of Inoculum Conditioning on Hydrogen Fermentation and pH Effect on Bacterial Community Relevant to Hydrogen Production', 100(5), pp. 524–530. doi: 10.1263/jbb.100.524.

Konde, K. S. *et al.* (2020) 'Sugarcane bagasse based biorefineries in India: potential and challenges', *Sustainable Energy & Fuels*. doi: 10.1039/d0se01332c.

Lakhundi, S., Siddiqui, R. and Khan, N. A. (2015) 'Cellulose degradation: A therapeutic

strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections’, *Parasites and Vectors*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s13071-015-0642-7.

Li, Y., Zhang, Q., Liu, Z. et al. (2022) ‘Genome mining discovery of hydrogen production pathway of *Klebsiella* sp. WL1316 fermenting cotton stalk hydrolysate’, *International Microbiology*. doi: 10.1007/s10123-022-00241-0.

Li, Y. et al. (2017) ‘Complete genome sequence of *Kosakonia oryzae* type strain Ola 51T’, *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), p. 28. doi: 10.1186/s40793-017-0240-8.

Lima, D. R. S. (2018) *Avaliação De Rotas Tecnológicas Para O Aproveitamento Energético Do Bagaço De Cana-De-Açúcar*. Universidade Federal de Ouro Preto.

Liu, C. et al. (2022) ‘Production of caproic acid by *Rummeliibacillus suwonensis* 3B-1 isolated from the pit mud of strong-flavor baijiu’, *Journal of Biotechnology*, 358, pp. 33–40. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.08.017.

Liu, Y. et al. (2020) ‘Consolidated Bioprocess for Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass Using *Clostridium thermocellum* DSM 1237’, *BioResources*, 15(4), pp. 8355–8368. doi: 10.15376/biores.15.4.8355-8368.

Liu, Y. et al. (2021) ‘Challenges and Future Perspectives of Promising Biotechnologies for Lignocellulosic Biorefinery’, *Molecules*, 26(17), p. 5411. doi: 10.3390/molecules26175411.

Loh, J. S. L. Z. K. C. (2021) ‘Review and perspectives of enhanced volatile fatty acids production from acidogenic fermentation of lignocellulosic biomass wastes’, *Bioresources and Bioprocessing*, 8. doi: 10.1186/s40643-021-00420-3.

Lu, J. et al. (2021) ‘Recent progress on bio-succinic acid production from lignocellulosic biomass’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(1), pp. 1–8. doi: 10.1007/s11274-020-02979-z.

Lun, K. et al. (2019) ‘Co-fermentation of glucose and xylose from sugarcane bagasse into

succinic acid by *Yarrowia lipolytica*', *Biochemical Engineering Journal*, 148(February), pp. 108–115. doi: 10.1016/j.bej.2019.05.004.

Maiti, P. *et al.* (2013) 'Anaerobic culture on growth efficient bi-layered culture plate in a modified candle jar using a rapid and slow combustion system', *Indian Journal of Medical Microbiology*, 31(2), pp. 173–176. doi: 10.4103/0255-0857.115218.

Mathivanan, K. *et al.* (2021) 'Characterization and Biotechnological Functional Activities of Exopolysaccharides Produced by *Lysinibacillus fusiformis* KMNTT-10', *Journal of Polymers and the Environment*, 29(6), pp. 1742–1751. doi: 10.1007/s10924-020-01986-3.

Mello, B. L. *et al.* (2016) 'Nutrient availability shapes the microbial community structure in sugarcane bagasse compost- derived consortia', *Nature Publishing Group*, (November), pp. 1–8. doi: 10.1038/srep38781.

Melo-Nascimento, A. O. do. S. *et al.* (2018) 'Functional characterization of ligninolytic *Klebsiella* spp. strains associated with soil and freshwater', *Archives of Microbiology*, 200(8), pp. 1267–1278. doi: 10.1007/s00203-018-1532-0.

Menegatto, M. B. da S. (2019) *Avaliação do potencial celulolítico e fermentativo de bactérias do gênero Clostridium e da microbiota autóctone na fermentação do bagaço de cana bruto*. Universidade Federal de Ouro Preto.

Mhuantong, W. *et al.* (2015) 'Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities', *Biotechnology for Biofuels*, 8. doi: 10.1186/s13068-015-0200-8.

Moon, R. J. *et al.* (2011) *Chem Soc Rev Cellulose nanomaterials review : structure , properties and nanocomposites*. doi: 10.1039/c0cs00108b.

Morlot, C. and Rodrigues, C. D. A. (2018) 'The New Kid on the Block: A Specialized Secretion System during Bacterial Sporulation', *Trends in Microbiology*, 26(8), pp. 663–

676. doi: 10.1016/j.tim.2018.01.001.

Moshokoa, M. F. *et al.* (2023) 'Influence of environmental factors on *Enterococcus faecium* for production of succinic acid in a batch reactor: A preliminary investigation', *Materials Today: Proceedings*. doi: 10.1016/j.matpr.2023.08.078.

Mounir, M. *et al.* (2016) 'Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(2), pp. 166–171. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.06.005.

Muhammed, N. S. *et al.* (2021) 'Recombinant Production and Characterization of an Extracellular Subtilisin-Like Serine Protease from *Acinetobacter baumannii* of Fermented Food Origin', *Protein Journal*, 40(3), pp. 419–435. doi: 10.1007/s10930-021-09986-5.

Mumtaz, M. Z. *et al.* (2019) 'Production of lactic and acetic acids by *Bacillus* sp. ZM20 and *Bacillus cereus* following exposure to zinc oxide: A possible mechanism for Zn solubilization', *Rhizosphere*, 12(September), p. 100170. doi: 10.1016/j.rhisph.2019.100170.

Mustafa, A. M. *et al.* (2018) 'Effect of hydrothermal and Ca(OH)₂ pretreatments on anaerobic digestion of sugarcane bagasse for biogas production', *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.028.

Nakaema, H. (2021) *Estratégias de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica para melhorar a produção de biogás e bioquímicos em biorrefinarias*. Universidade Federal de São Carlos.

NJOKU, C. C. and ANTAI, S. P. (1987) 'Lignocellulose degradation and crude protein formation by three ligninolytic *Streptomyces* strains', *Letters in Applied Microbiology*, 4(6), pp. 133–136. doi: 10.1111/j.1472-765X.1987.tb01600.x.

Okolie, J. A. *et al.* (2020) 'Chemistry and Specialty Industrial Applications of

Lignocellulosic Biomass’, *Waste and Biomass Valorization*, (0123456789). doi: 10.1007/s12649-020-01123-0.

Oliveira, A. C. D. de (2021) *O uso de extrato de orégano (origanum vulgare) contra microrganismos contaminantes na fermentação de etanol de cana-de-açúcar*. Universidade Federal de São Carlos.

Ollivier, B. *et al.* (1985) ‘Isolation and characterization of *Sporomusa acidovorans* sp. nov., a methylotrophic homoacetogenic bacterium’, *Archives of Microbiology*, 142(3), pp. 307–310. doi: 10.1007/BF00693409.

Oreoluwa Jokodola, E. *et al.* (2022) ‘Process optimisation for production and recovery of succinic acid using xylose-rich hydrolysates by *Actinobacillus succinogenes*’, *Bioresource Technology*, 344(PB), p. 126224. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126224.

Orsi, R. H. and Wiedmann, M. (2016) ‘Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), pp. 5273–5287. doi: 10.1007/s00253-016-7552-2.

Panda, A. K. *et al.* (2014) ‘*Brevibacillus* as a biological tool: a short review’, *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), pp. 623–639. doi: 10.1007/s10482-013-0099-7.

Papadaki, E. *et al.* (2020) ‘Processing wastewaters from Spanish-style cv. Chalkidiki green olives: A potential source of *enterococcus casseliflavus* and hydroxytyrosol’, *Microorganisms*, 8(9), pp. 1–21. doi: 10.3390/microorganisms8091274.

Parsae, M. *et al.* (2019) ‘A review of biogas production from sugarcane vinasse’, *Biomass and Bioenergy*, 122(May 2018), pp. 117–125. doi: 10.1016/j.biombioe.2019.01.034.

Passera, A. *et al.* (2021) ‘Characterization of *Lysinibacillus fusiformis* strain S4C11: In vitro, in planta, and in silico analyses reveal a plant-beneficial microbe’, *Microbiological Research*, 244, p. 126665. doi: 10.1016/j.micres.2020.126665.

Patel, A. and Shah, A. R. (2021) 'Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products', *Journal of Bioresources and Bioproducts*, (September 2020), pp. 1–21. doi: 10.1016/j.jobab.2021.02.001.

Peng L, Xie N, Guo L, Wang L, Y. B. (2014) 'Efficient Open Fermentative Production of Polymer- Grade L-Lactate from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by', *Plos One*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0107143.

Poehlein, A., Gottschalk, G. and Daniel, R. (2013) 'First insights into the genome of the Gram-negative, endospore-forming organism *Sporomusa ovata* strain H1 DSM 2662', *Genome Announcements*, 1(5), pp. 5–6. doi: 10.1128/genomeA.e00734-13.

Prabhu, A. A. *et al.* (2020) 'Bioproduction of succinic acid from xylose by engineered *Yarrowia lipolytica* without pH control', *Biotechnology for Biofuels*, 13, pp. 1–15. doi: 10.1186/s13068-020-01747-3.

Rabelo, C. A. B. S. *et al.* (2018) 'Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors', *Journal of Environmental Management*, 223(July), pp. 952–963. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.07.015.

Rahmati, S. *et al.* (2020) 'Pretreatment and fermentation of lignocellulosic biomass: Reaction mechanisms and process engineering', *Reaction Chemistry and Engineering*, 5(11), pp. 2017–2047. doi: 10.1039/d0re00241k.

Raj, M. *et al.* (2023) 'Succinic acid: applications and microbial production using organic wastes as low cost substrates', *Physical Sciences Reviews*. doi: 10.1515/psr-2022-0160.

Reimer, L. C. *et al.* (2022) 'Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data', *Nucleic Acids Research*, 50(D1), pp. D741–D746. doi: 10.1093/nar/gkab961.

Rezania, S. *et al.* (2020) 'Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass

for bioethanol production: An overview', *Energy*, 199, p. 117457. doi: 10.1016/j.energy.2020.117457.

Ribeiro, E., Nei, B. and Jr, P. (2011) 'Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*', *Microbiol Biotechnol*, 38, pp. 1001–1011. doi: 10.1007/s10295-010-0874-7.

Rouches, E. *et al.* (2016) 'Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass : A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 59, pp. 179–198. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.317.

Saeed Soleimani, S.-O. R.-S. (2016) 'Preparation and optimization of cellulase cocktail to improve the bioethanol process', *Biofuels*, 7269(October). doi: 10.1080/17597269.2016.1224293.

Salehi, R. and Chaiprapat, S. (2021) 'Conversion of biogas from anaerobic digestion to single cell protein and bio-methanol: mechanism, microorganisms and key factors - A review', *Environmental Engineering Research*, 27(4), pp. 210109–0. doi: 10.4491/eer.2021.109.

Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. (2004) 'Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production', *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), pp. 1–17. doi: 10.1139/w03-076.

Schink, B. and Zeikus, J. G. (1980) 'Microbial methanol formation: A major end product of pectin metabolism', *Current Microbiology*, 4(6), pp. 387–389. doi: 10.1007/BF02605383.

Senatore, A. *et al.* (2021) 'Lignocellulosic biomass conversion into bioenergy: feedstock overview', *Journal of Phase Change Material*, 1(1), p. 12. doi: 10.58256/jpcm.v1i1.7

Setter, C. *et al.* (2020) 'The effects of kraft lignin on the physicochemical quality of briquettes produced with sugarcane bagasse and on the characteristics of the bio-oil obtained via slow pyrolysis', *Fuel Processing Technology*, 210(April), p. 106561. doi:

10.1016/j.fuproc.2020.106561.

Sheng, Y. *et al.* (2021) ‘Bioresource Technology Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin’, *Bioresource Technology*, 324(December 2020), p. 124631. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124631.

SILVA, F. C. (2017) *Avaliação Da Condição Nutricional E Do Tipo De Inóculo Na Geração De Bioprodutos A Partir Da Fermentação De Glicerol Residual*. Universidade Federal de Ouro Preto.

Silva, R. N. da and Lima, F. E. de (2020) ‘Estudo do impacto do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar em sistemas de cogeração’, *Geama*, 6(2), pp. 25–33. <https://journals.ufrpe.br/index.php/geama/article/view/3029>

Sindhu, R., Binod, P. and Pandey, A. (2015) ‘Bioresource Technology Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview’, *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.030.

Singh, N. *et al.* (2019) ‘Influence of substrate loadings on the consolidated bioprocessing of rice straw and sugarcane bagasse biomass using *Ruminiclostridium thermocellum*’, *Bioresource Technology Reports*, 7(November 2018), p. 100138. doi: 10.1016/j.biteb.2019.01.010.

Soares, L. A. *et al.* (2018) ‘Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities’, *Waste and Biomass Valorization*, 10(7), pp. 1899–1912. doi: 10.1007/s12649-018-0201-5.

Soares, L. A. *et al.* (2019) ‘Experimental design and syntrophic microbial pathways for biofuel production from sugarcane bagasse under thermophilic condition’, *Renewable Energy*, 140, pp. 852–861. doi: 10.1016/j.renene.2019.03.103.

Soares, L. A. *et al.* (2020) ‘Screening and Bioprospecting of Anaerobic Consortia for

Biofuel Production Enhancement from Sugarcane Bagasse', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(1), pp. 232–251. doi: 10.1007/s12010-019-03074-2.

SOKOLOWSKEI, D. and JUNIOR, E. C. D. S. (2020) *Prospecção In Silico De Enzimas Do Complexo Ligninocelulolítico Em Bacillus thuringiensis*. Centro Universitário de Brasília.

Son, H.-J. *et al.* (2001) 'Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 33(1), p. 1. doi: 10.1042/BA20000065.

Song, Q. L. X. Z. Y. S. D. L. Y. (2012) 'Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella Pneumoniae* from enzymatic hydrolyzate of sugarcane bagasse', *BioResoucers*, 7(4), pp. 4517–4530.

Stackebrandt, E., Kiedde, R. M. and Jones, D. (2006) 'The Genus *Kurthia*', in *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US, pp. 519–529. doi: 10.1007/0-387-30744-3_15.

Steinert, G. *et al.* (2014) 'Application of Diffusion Growth Chambers for the Cultivation of Marine Sponge-Associated Bacteria', *Marine Biotechnology*, 16(5), pp. 594–603. doi: 10.1007/s10126-014-9575-y.

Su, H. *et al.* (2015) 'A biorefining process : Sequential , combinational lignocellulose pretreatment procedure for improving biobutanol production from sugarcane bagasse', *Bioresource Technology*, 187, pp. 149–160. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.107.

Sun, L. *et al.* (2021) 'Cellulosic ethanol production by consortia of *Scheffersomyces stipitis* and engineered *Zymomonas mobilis*', *Biotechnology for Biofuels*, 14, pp. 1–13. doi: 10.1186/s13068-021-02069-8.

Thelma K. Morales-Martínez, Deniss I. Díaz-Blanco, José A. Rodríguez-de la Garza, Jesús Morlett-Chávez, Agustín J. Castro-Montoya, Julián Quintero, Germán Aroca, L. J. R.-G. (2017) 'Assessment of Different Saccharification and Fermentation Configurations

for Ethanol Production from Agave lechuguilla', *BioResources*, 12, pp. 8093–8105.

Tocheva, E. I. *et al.* (2013) 'Polyphosphate storage during sporulation in the Gram-negative bacterium *Acetonema longum*', *Journal of Bacteriology*, 195(17), pp. 3940–3946. doi: 10.1128/JB.00712-13.

Tondro, H. *et al.* (2020) 'Biological production of hydrogen and acetone- butanol-ethanol from sugarcane bagasse and rice straw using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium acetobutylicum*', *Biomass and Bioenergy*, 142(October), p. 105818. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105818.

Torres, C. *et al.* (2018) 'Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin', *Microbiology Spectrum*. Edited by F. M. Aarestrup *et al.*, 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.

Tran, H. T. M. *et al.* (2010) 'Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone–butanol–ethanol production from cassava starch', *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), pp. 260–267. doi: 10.1016/j.bej.2009.11.001.

Tu, Z. *et al.* (2019) 'Characterization of the microbiota in long- and short-term natural indigo fermentation', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(12), pp. 1657–1667. doi: 10.1007/s10295-019-02223-0.

Unrean, P. and Ketsub, N. (2018) 'Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse', *Industrial Crops & Products*, 123(April), pp. 238–246. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.071.

Vaishampayan, P. *et al.* (2009) 'Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura *et al.* 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(5), pp. 1094–1099. doi: 10.1099/ijs.0.006098-0.

Varesche, R. P. R. T. P. D. I. K. S. M. B. A. (2015) 'Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification',

International Journal of Hydrogen Energy, 40(19), pp. 6296–6306. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.03.067.

Ventorino, V. *et al.* (2015) ‘Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application’, *Scientific Reports - Nature*, 5, pp. 1–13. doi: 10.1038/srep08161.

Verardi, A. *et al.* (2020) *Bioconversion of lignocellulosic biomass to bioethanol and biobutanol, Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*. INC. doi: 10.1016/B978-0-12-815936-1.00003-4.

Virmani, S. *et al.* (2023) ‘Lignin Degradation by Isolated Lignolytic *Acinetobacter baumannii* S2, *Aspergillus niger* SF4 and *Rhodotorula glutinis* and Profiling Products from Bio-Valorization Perspective’, *Waste and Biomass Valorization*. doi: 10.1007/s12649-023-02140-5.

Wang, K. *et al.* (2019) ‘Biotechnology for Biofuels A novel thermostable GH10 xylanase with activities on a wide variety of cellulosic substrates from a xylanolytic *Bacillus* strain exhibiting significant synergy with commercial Celluclast 1.5 L in pretreated corn stover hydroly’, *Biotechnology for Biofuels*, pp. 1–13. doi: 10.1186/s13068-019-1389-8.

Wegelius, O. (2018) *Liquefaction Of Lignin: Uncatalysed And Catalysed Ethanolysis*. Aalto University.

Wei, D. *et al.* (2013) ‘2-Ketogluconic acid production by *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.6366’, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(6), pp. 561–570. doi: 10.1007/s10295-013-1261-y.

Wei, D., Liu, X. and Yang, S. (2013) ‘Butyric acid production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor’, *Bioresource Technology*, 129, pp. 553–560. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.065.

Wu, D. *et al.* (2019) ‘Bioresource Technology Improved lignocellulose degradation e ffi

ciency based on Fenton pretreatment during rice straw composting’, 294(August). doi: 10.1016/j.biortech.2019.122132.

Wu, D. *et al.* (2022) ‘Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives’, 286(June 2021). doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131635.

Wu, K. and Cheng, L. (2021) ‘Ruminiclostridium’, in Xu, X. (ed.) *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp. 1–11. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01924.

Xie, G. *et al.* (2007) ‘Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*’, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), pp. 3536–3546. doi: 10.1128/AEM.00225-07.

Xiu, Z. L. *et al.* (2007) ‘Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions’, *Biochemical Engineering Journal*, 33(1), pp. 42–52. doi: 10.1016/j.bej.2006.09.027.

Xu, C. *et al.* (2021) ‘Co-fermentation of succinic acid and ethanol from sugarcane bagasse based on full hexose and pentose utilization and carbon dioxide reduction’, *Bioresource Technology*, 339(July), p. 125578. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125578.

Yutin, N. and Galperin, M. Y. (2013) ‘A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia’, *Environmental Microbiology*, 15(10), p. n/a-n/a. doi: 10.1111/1462-2920.12173.

Zhang, X.-Z. *et al.* (2011) ‘One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*’, *Metabolic Engineering*, 13(4), pp. 364–372. doi: 10.1016/j.ymben.2011.04.003.

Zhao, X., Song, Y. and Liu, D. (2011) ‘Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of alkali / peracetic acid-pretreated sugarcane bagasse

for ethanol and 2,3-butanediol production', *Enzyme and Microbial Technology*, 49(4), pp. 413–419. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.07.003.

Zhou, M. *et al.* (2017) 'Sino-Forest Applied Research Centre for Pearl River Delta Environment', *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.121.

Ziadi, M. *et al.* (2020) 'Bioreactor Scale-Up and Kinetic Modeling of Lactic Acid and Biomass Production by *Enterococcus faecalis* SLT13 during Batch Culture on Hydrolyzed Cheese Whey', *Journal of Chemistry*, 2020, pp. 1–9. doi: 10.1155/2020/1236784.

Zong, H. *et al.* (2017) 'Construction of glycerol synthesis pathway in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glucose into 1,3-propanediol', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(5), pp. 549–555. doi: 10.1007/s12257-016-0375-2.

