



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ABRAÃO BRITO PEIXOTO

**MODELAGEM MATEMÁTICA PARA A OTIMIZAÇÃO DA
CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS E
PRODUÇÃO DE ENZIMAS E BIOETANOL**

Feira de Santana, BA

2022

ABRAÃO BRITO PEIXOTO

**MODELAGEM MATEMÁTICA PARA A OTIMIZAÇÃO DA
CINÉTICA DO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS E
PRODUÇÃO DE ENZIMAS E BIOETANOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Acosta Martínez
Co-Orientador: Prof. Dr. José Aílton Conceição Bispo

Feira de Santana, BA

2022

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Peixoto, Abraão Brito
P43m Modelagem matemática para a otimização da cinética do crescimento de leveduras e produção de enzimas e bioetanol. / Abraão Brito Peixoto. – 2022.
143 f.; il.

Orientador: Ernesto Acosta Martinez
Co-orientador: José Aílton Conceição Bispo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2022.

1.Fermentação. 2.Hidrólise. 3.Enzima. Amido. I.Martinez, Ernesto Acosta, orient.
II. Bispo, José Aílton Conceição, co-orient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 664.2.033

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

BANCA EXAMINADORA



Dr. Marcus Bruno Soares Forte
(Universidade Estadual de Campinas)



Dr.ª Elizama Aguiar de Oliveira
(Universidade Estadual de Santa Cruz)



Dr. César Augusto Piedrahíta Aguirre
(Universidade Federal da Bahia)



Dr.ª Ana Paula Manera Ziotti
(Universidade Federal do Pampa)



Dr. Ernesto Acosta Martinez
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

**Feira de Santana – BA
2022**

Ao meu filho Francisco



*“Se você não dá cem por cento de si em
cem por cento do tempo, você é uma perda de
tempo”*



Felipe Amorim
Sócio Fundador da Academia Alta Renda

Vallema Alta

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram: modelar matematicamente a hidrólise enzimática, a produção de bioetanol e o padrão de crescimento de leveduras previamente selecionadas. A caracterização da enzima foi realizada pelo estudo da atividade enzimática nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C. Duas cepas de leveduras (LEB-T07 e LEB-AAQ5B) foram selecionadas e demonstraram capacidade de produção de amilases e etanol, respectivamente. As leveduras produziram amilases com atividade enzimática de até 10,41 U/mL. Na segunda fase, buscou-se realizar modelagem matemática, inspirada na Equação de Transferência de Boltzmann. Foram determinadas condições ótimas para a produção de enzimas pela cepa LEB-T07: tempo de fermentação de 120 h, cujas enzimas alcançam maior atividade (9,19 U/mL) a 60 °C. As cepas de levedura LEB-AAQ5B exibem condições ótimas para produção de etanol: tempo de fermentação de 220 h sob aeração de aproximadamente 0,7 vvm, em que se observa a síntese de etanol numa concentração de 1,4 g/L. Definiram-se os parâmetros cinéticos de crescimento de duas cepas de levedura *Myriangiium* sp. (Y6511 e Y6512) em meio Sabouraud nas temperaturas de 26, 30 e 34 °C no tempo t variando de 0 a 36 h. A concentração celular máxima foi de 34,00 g/L. A taxa de crescimento específico máxima foi 0,30 h⁻¹ na condição de crescimento a 26 °C. A produtividade em biomassa máxima foi 2,75 g/L.h a 26 °C. Os parâmetros observados adequam-se à produção de massa celular, em batelada ou processo contínuo, enzimas e outros bioprodutos de interesse comercial.

Palavras-chave: fermentação, hidrólise, enzima, amido

ABSTRACT

The objectives of this work were mathematical modeling of enzymatic hydrolysis, bioethanol production and growth pattern of previously selected preparations. The enzyme action was performed by studying the enzyme activity at temperatures of 40, 50, and 60 °C. Two yeast strains (LEB-T07 LEB-AAQ5B) were selected and capable of producing amylase and ethanol, respectively. Yeasts are producing amylases with enzymatic activity of up to 10.41 U/mL. In the second phase, we sought to perform mathematical modeling, inspired by the Boltzmann Transfer Equation. The optimal enzymes for the production of strain LEBT07 were determined: fermentation conditions of 120 h, whose enzymes reach the highest activity (9.19 U/mL) at 60 °C. LEB-AAQ5B yeast strains exhibit optimal conditions for ethanol production: fermentation time of 220 h under aeration of approximately 0.7 vvm, in which ethanol synthesis is observed at a concentration of 1.4 g/L. To define the kinetic parameters of growth of two strains of *Myriangium* sp. (Y6511 and Y6512) in Sabouraud medium at temperatures of 26, 30 and 34 °C at time t ranging from 0 to 36 h. The maximum cell concentration was 34.00 g/L. The maximum specific growth rate was 0.30 h⁻¹ under the growth condition at 26 °C. The maximum biomass productivity was 2.75 g/L.h at 26 °C. The observed parameters are suitable for the production of cell mass, in batch or in a continuous process, enzymes and other bioproducts of commercial interest.

Keywords: fermentation, hydrolysis, enzyme, starch.

Lista de Ilustrações

Figura 1.1 – Esquema da via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) desde glicose até piruvato.....	24
Figura 1.2–Demanda de petróleo antes e depois da situação de pandemia causada pela Covid-19.....	30
Figura 1.3– Crescimento da produção de biocombustíveis em mercados chave para o período de 2019 a 2024.	32
Figura 1.4 – Dados comparativos entre a produção de biocombustíveis e açúcar para o período de 2018 a 2020 e projeções para o ano 2030.....	37
Figura 1.5– Produção mundial de cana de açúcar em 2019.	37
Figura 1.6 – Esquema da degradação da molécula de amido pelas amilases.....	44
Figura 1.7 – Reações catalisadas pelas celulases: Quebra das interações não covalentes presentes na estrutura amorfa da celulose (endocelulase) Hidrólise das extremidades da cadeia para quebrar o polímero em açúcares menores (exocelulase) Hidrólise de dissacarídeos e tetrassacarídeos em glicose (beta-glicosidase).	48
Figura 1.8 – Enzimas envolvidas na degradação da celulose (KUMLA et al., 2020)....	50
Figura 1.9 – Estrutura de xilana com sítios específicos para ação das enzimas xilanolíticas.	55
Figura 1.10- Mecanismo catalítico de β eliminação de poligalacturonato liase (PGLs) e polimetilgalacturonato liase (PMGLs). A. Modo de ação em PGLs e PMGLs (X: –O–, o substrato é pectinato, X: –O–CH ₃ , o substrato é pectina); B. Mecanismo catalítico de β eliminação assistido por Ca ²⁺ ; C. Mecanismo catalítico comum de β eliminação em PGLs e PMGLs (Lys/Arg como base catalítica). Fonte: ZHENG et al., 2021.....	57
Figura 1.11 – Dados experimentais hipotéticos.....	58
Figura 1.12 – Regiões em que foram coletadas as amostras com respectivos números de leveduras para cada região.....	59
Figura 1.13 – Resultado positivo do teste de atividade enzimática em meio sólido antes (à esquerda) e depois (à direita) da adição da solução de lugol.	61
Figure 2.1- Illustrative methodology for production of amylases	80
Figure 2.2 - Hypothetical experimental data.	81

Figure 2.3 - Experimental data from Enzyme Activity for the samples performed in 3 batches; A.1, Batch 1; B.1, Batch 2; C.1, Batch 3; and their respective approximations using the mathematical model adopted for process optimization; A.2, Batch 1; B.2, Batch 2; and C.2, Batch 3.....	83
Figure 2.4 - Adjustments of the experimental points through the mathematical model adopted for the optimization for each batch, according to different temperatures 40, 50 and 60 °C (A, B and C). The values for the determination coefficients (R ²) are displayed as well as the residuals for each experimental point studied	85
Figure 2.5 - Response surface and contour curve for amylase activity by LEB-T07 strain under experimental conditions for each batch. A.1, response surface for Batch 1; B.1, response surface for Batch 2; C.1, response surface for Batch 3; A.2, contour curve for Batch 1; B.2, contour curve for Batch 2; C.2, contour curve for Batch.	87
Figure 2.6 - Response surface and contour curve resulting from the derivation of the fitting equations from the experimental data. A.1, response surface for Batch 1; B.1, response surface for Batch 2; C.1, response surface for Batch 3; A.2, contour curve for Batch 1; B.2, contour curve for Batch 2; C.2, contour curve for Batch 3.	90
Figura 3.1- Dados experimentais obtidos para a concentração de etanol (A) nas condições sem aeração (■) e com aeração de 1,0 vvm (▲) e a aproximação observada por meio do modelo matemático adotado para o estudo do processo (B)	104
Figura 3.2 – Ajuste dos pontos experimentais por meio do modelo matemático adotado para o estudo (à esquerda) e os resíduos calculados para cada ponto experimental (à direita) na condição de reação sem aeração.....	105
Figura 3.3 – Ajuste dos pontos experimentais por meio do modelo matemático adotado para o estudo (à esquerda) e os resíduos calculados para cada ponto experimental (à direita) na condição de reação sob aeração de 1,0 vvm.....	105
Figura 3.4 - Superfície de resposta (à esquerda) e curva de contorno (à direita) para a concentração de etanol produzido pela linhagem LEB-AAQ5B nas condições experimentais estabelecidas para aeração de 0,0 e 1,0 vvm.....	106
Figura 3.5 - Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de contorno (à direita) resultantes da derivação das equações de ajuste dos dados experimentais relativos às bateladas nas condições estudadas.....	107
Figura 4.1 – Dados experimentais do crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. (A: Y6511 e B: Y6512) em meio Sabouraud nas temperaturas de 26 °C (●), 30 °C (▲) e 34 °C (■). MU: massa úmida.....	120

Figura 4.2 - Ajuste do modelo matemático aos dados experimentais do crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e respectivos resíduos (A.2: Y6511; B.2: Y6512) em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta.	121
Figura 4.3 - Superfície de resposta (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e curvas de contorno (A.2: Y6511; B.2: Y6512) construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Dados para a curva de contorno consideram o parâmetro MU (g/L) fixo para uma variação dos parâmetros T (°C) e t (h).	125
Figura 4.4 - Curvas de contorno construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Em A.1 (Y6511) e A.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro t (h) fixo para uma variação dos parâmetros MU (g/L) e T (°C). Em B.1 (Y6511) e B.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro T (°C) fixo para uma variação dos parâmetros MU (g/L) e t (h).	127
Figura 4.5 - Superfície de resposta (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e curvas de contorno (A.2: Y6511; B.2: Y6512) construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Dados para a curva de contorno consideram o parâmetro Produtividade [dMU/dt (g/L.h)] fixo para uma variação dos parâmetros T (°C) e tempo (h).	129
Figura 4.6 - Curvas de contorno construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Em A.1 (Y6511) e B.1 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro t (h) fixo para uma variação dos parâmetros Produtividade [dMU/dt (g/L.h)] e T (°C). Em A.2 (Y6511) e B.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro T (°C) fixo para uma variação dos parâmetros Produtividade [dMU/dt (g/L.h)] e t (h).	130
Figura 4.7 - Superfície de resposta (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e curvas de contorno (A.2: Y6511; B.2: Y6512) construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Dados para a curva de contorno consideram o parâmetro dMU/dT (g/L.°C) fixo para uma variação dos parâmetros T (°C) e t (h). Considerando dMU/dT (g/L.°C) como a taxa de variação da concentração celular, dependente da temperatura do processo..	132

Figura 4.8 - Curvas de contorno construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Em A.1 (Y6511) e B.1 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro t (h) fixo para uma variação dos parâmetros dMU/dT (g/L.°C) e T (°C). A.2 (Y6511) e B.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro T (°C) fixo para uma variação dos parâmetros dMU/dT (g/L.°C) e t (h). Considerando dMU/dT (g/L.°C) como a taxa de variação da densidade celular, dependente da temperatura do processo.	133
Figura 6.1 - Resultados para o cálculo dos parâmetros ϕ_1 a ϕ_{10} do modelo obtido, representadas as bateladas 1, 2 e 3 para a produção das amilases.....	140
Figura 6.2 - Resultados para o cálculo dos parâmetros ϕ_1 a ϕ_{11} do modelo obtido para a produção de etanol.....	141
Figura 7.1 - Fluxograma lógico utilizado no tratamento de dados pelo Matlab R2014a	143

Lista de Tabelas

Tabela 1.1- Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2020/2021	34
Tabela 1.2- Área colhida com cana-de-açúcar, 2018	35
Tabela 1.3 – Relação dos microrganismos da cultura estoque coletados em distintas regiões do Brasil. CE: microrganismos coletados no Cerrado; FA: Floresta Amazônica; MA I: Mata Atlântica (vegetação próxima ao mar); MA II: Mata Atlântica (vegetação interiorana); PA: Pantanal; XA: microrganismos isolados de xarope; RQ: isolados de resíduo de queijo; SC: microrganismo sem codificação ou de origem desconhecida.	59
Table 2.1- Experimental data of enzymatic activity extracted from the proposed assays.....	82
Tabela 4.1 - Dados cinéticos relativos ao crescimento de <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud.	119
Tabela 4.2 - Dados estatísticos calculados por meio do software Matlab 2014a para a levedura <i>Myriangium</i> sp., cepas Y6511 e Y6512, submetida ao crescimento em meio Sabouraud nas temperaturas de 26 °C, 30 °C e 34 °C.	122
Tabela 4.3 - Coeficientes da equação de ajuste proposta para a modelagem matemática do crescimento de <i>Myriangium</i> sp., cepas Y6511 e Y6512, em meio Sabouraud nas temperaturas de 26 °C, 30 °C e 34 °C.....	123
Tabela 4.4 – ANOVA para os dados do crescimento da cepa <i>Myriangium</i> sp., cepas Y6511 e Y6512, em meio Sabouraud com significância de 5 %.....	123
Tabela 4.5– Teste de Tukey aplicado às médias da concentração celular de <i>Myriangium</i> sp. (Y6511 e Y6512) em meio Sabouraud.	124

Lista de Abreviaturas e Siglas

AE – Atividade Enzimática

AFDC - Alternative Fuels Data Center

AGU - Quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 μmol de maltose por minuto sob condições específicas

ATP – Trifosfato de Adenosina

CBI - Caribbean Basin Initiative

CDB - Convenção sobre a Diversidade Biológica

CI - Conservation International

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional

DE – Dextrose Equivalente

DEAE - Dietilaminoetil celulose

ERS - Economic Research Service

EUA – Estados Unidos da América

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

GRAS - Generally Recognized as Safe

GYMP – Glucose Yeast Malt Phosphate

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISO - International Organization for Standardization

KNU - kilo Novo Units

ONG - Organização não governamental

PEG – Polietilenoglicol

REBIA - Rede Brasileira de Informação Ambiental

UNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar

USDA – United States Department of Agriculture

WLN - Wallerstein Laboratory Nutrient

Lista de Símbolos

$[E]$ – Concentração de enzima

E_0 – Concentração inicial de enzima

E_a – Energia de ativação

E_d – Energia de desnaturação da enzima

e – Constante de Euler ($\approx 2,71$)

K_M – Constante cinética da Equação de Michaelis-Menten

K – Constante cinética da Equação de Michaelis-Menten

K_0^* - Constante cinética hipotética para uma temperatura infinitamente alta

K_d – Constante cinética de desnaturação da enzima

K_d^* - Constante cinética de desnaturação da enzima na condição inicial

R – Constante Universal dos gases

S – Concentração de substrato

T – Temperatura absoluta

$t_{1/2}$ – Tempo de meia vida

V – Velocidade da reação

V_0 – Velocidade inicial da reação

V_{max} – Velocidade máxima da reação

Sumário

Introdução	19
Objetivo geral	21
Objetivos específicos	21
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica Geral	22
1.1. Leveduras	23
1.2. Catalisadores Químicos	25
1.3. Enzimas	26
1.4. Cinética Enzimática	27
1.5. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática	28
1.6. O Mercado mundial de combustíveis	29
1.7. O Bioetanol	31
1.8. Energias Renováveis	31
1.9. A Sustentabilidade na Produção do Bioetanol	32
1.10. Fatores Agronômicos Associados à Produção do Bioetanol	33
1.11. Leveduras Etanologênicas	40
1.12. Enzimologia das amilases	43
1.13. Amilases de Origem Bacteriana	44
1.14. Amilases Produzidas por Fungos Filamentosos e Leveduras	46
1.15. Enzimologia das Celulases	47
1.15.1. Matéria Lignocelulósica e Produção de Álcool Combustível	47
1.15.2. Degradação de lignoceluloses por meio de enzimas	49
1.15.3. Fatores que afetam a hidrólise enzimática da lignocelulose	53
1.15.4. Xilanases e degradação de xilana	55
1.15.5. Pectinas e enzimas pectinolíticas	56
1.16. Materiais e Métodos	57
1.16.1. Modelagem matemática	57
1.16.2. Coleta e isolamento dos microrganismos oriundos do Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos (LEMeB/Unicamp)	59
1.16.3. Seleção das leveduras produtoras de amilases	61
1.16.4. Verificação da produção de gás em meio líquido	61
1.17. Referências Bibliográficas	62
Capítulo 2 - Amylase Production Using Brazilian Wild Yeast and Simple Fermentation	74
2.1 Abstract	75
2.2 Resumo	75

2.3 Introduction	76
2.4 Materials and Methods	78
2.4.1 Acquisition of yeast strains.....	78
2.4.2 Reaction medium for fermentation.....	78
2.4.3 Fermentation Equipment	78
2.4.4 Sampling.....	79
2.4.5 Enzymatic Activity	79
2.4.6 Mathematical Modeling Conditions	80
2.5 Results and Discussion.....	82
2.6 Conclusion.....	91
2.7 References	92
Capítulo 3 - Otimização da Produção de Bioetanol a partir de Amido por Leveduras Silvestres em Batelada Simples	96
3.1 Resumo	97
3.2 Abstract	98
3.3 Introdução.....	98
3.4 Material e Métodos.....	101
3.4.1 Aquisição das cepas de leveduras.....	101
3.4.2 Meio reacional para fermentação.....	102
3.4.3 Fermentador.....	102
3.4.4 Processos fermentativos.....	102
3.4.5 Amostragem.....	102
3.4.6 Análise da concentração de etanol.....	102
3.4.7 Condições da Modelagem Matemática.....	102
3.5 Resultados e Discussões	103
3.6 Conclusões.....	108
3.7 Referências	110
Capítulo 4 - Crescimento de <i>Myriangium</i> sp. em meio Sabouraud: uma nova abordagem sobre a definição de parâmetros cinéticos.....	113
4.1 Resumo	114
4.2 Abstract	114
4.3 Introdução.....	115
4.4 Objetivo Geral	116
4.4.1 Objetivos específicos	116
4.5 Metodologia.....	116

4.5.1	Origem do Microrganismo	116
4.5.2	Preparo do inóculo	117
4.5.2.1	Ativação do Microrganismo.....	117
4.5.2.2	Formação da cultura estoque.....	117
4.5.3	Protocolo de Crescimento e Amostragem	117
4.5.4	Estudo cinético do crescimento da biomassa	117
4.5.4.1	Modelagem Matemática e Avaliação Estatística dos Dados.....	118
4.6	Resultados e Discussões	118
4.7	Conclusões.....	133
4.8	Referências	134
Capítulo 5 - Considerações Finais		137
5.1	Sugestões para trabalhos futuros	138
Apêndice	139
Anexo	142

Introdução

O Brasil foi o primeiro signatário da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), e é considerado megabiodiverso – país que reúne ao menos 70 % das espécies vegetais e animais do Planeta – pela *Conservation International* (CI). Abriga sete biomas, 49 ecorregiões, já classificadas, e incalculáveis ecossistemas. A biota terrestre possui uma flora rica, com até 56.000 espécies de plantas superiores, já descritas; acima de 3.000 espécies de peixes de água doce; 517 espécies de anfíbios; 1.677 espécies de aves; e 518 espécies de mamíferos; pode ter até 10 milhões de espécies de insetos (REBIA, 2020).

Devido à grande diversidade ecológica, as espécies pertencentes à fauna e à flora brasileira talvez não venham a ser conhecidas em sua totalidade. Contudo, a destruição de parcelas, ainda que pequenas, destes ecossistemas pode significar a perda irreversível de inúmeras espécies, por vezes sequer estudadas pela ciência (IBAMA, 2007).

No contexto da variabilidade ecológica, atenção particular deve ser dada à microbiota silvestre existente no território brasileiro, que pode ser de grande interesse à indústria alimentícia, farmacêutica e química. A capacidade produtora de insumos pode substituir processos químicos por processos biológicos. Quanto a estes, visa-se a manutenção das benesses ao meio ambiente em detrimento da degradação ecológica daqueles. Como exemplo, cita-se a substituição de hidrólises ácidas por hidrólises enzimáticas com enzimas microbianas preparadas para cada ocasião.

Atualmente, há um grande interesse em se adquirir espécies de microrganismos ainda não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria de alimentos bem como o de aperfeiçoar processos de produção desses insumos a partir de microrganismos já conhecidos. Em particular, as amilases, uma das principais enzimas utilizadas industrialmente, além da redução de gastos energéticos associados à produção de detergentes, por exemplo, aumenta significativamente a qualidade do produto final. Ainda, sua utilização está de acordo com as normas estabelecidas pela ISO 14000 referente ao impacto ambiental (AZEMA et al., 1995).

A queima de combustíveis fósseis dispensa alta carga de dióxido de carbono na atmosfera além de ser oriundo de uma fonte não renovável. Esse mecanismo de combustão potencializa o efeito estufa, que está associado às mudanças climáticas observadas em todo mundo.

Organizações não Governamentais (ONGs) ou órgãos do governo alertam para a necessidade de se encontrar vias alternativas para a redução da carga de dióxido de carbono na atmosfera sem que outros componentes do ecossistema sejam agredidos. Essa filosofia de estudo gerou o que hoje é conhecido como sustentabilidade.

Assim, a produção de bioetanol tem grande repercussão, pois trata-se de um combustível com fonte renovável. Além disso, os cultivares destinados à produção de bioetanol, além de reduzirem a carga de CO₂ na atmosfera decorrente do plantio, o etanol gerado tem combustão com menor geração deste gás em relação à queima de combustíveis fósseis. Além disso, melhoramentos no cultivo ou no processo de produção do combustível podem tornar ainda mais valiosa a utilização desta via alternativa para a produção de energia a partir da biomassa.

Objetivo geral

O desenvolvimento deste trabalho objetivou modelar matematicamente os processos de produção de biomassa, amilases ou etanol, com vistas à otimização dos parâmetros de processo de bancada de laboratório.

Objetivos específicos

1. Identificar os produtos de fermentação com vistas à produção de etanol;
2. Caracterizar o caldo amilolítico produzido por meio do perfil de temperatura e atividade enzimática;
3. Otimizar os parâmetros de fermentação para produção de etanol
4. Otimizar os parâmetros de fermentação para produção de amilases.
5. Definir a temperatura ótima de crescimento para produção de biomassa
6. Calcular os parâmetros cinéticos de crescimento
7. Determinar os parâmetros do modelo matemático adotado para a modelagem do processo

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica Geral

1.1. Leveduras

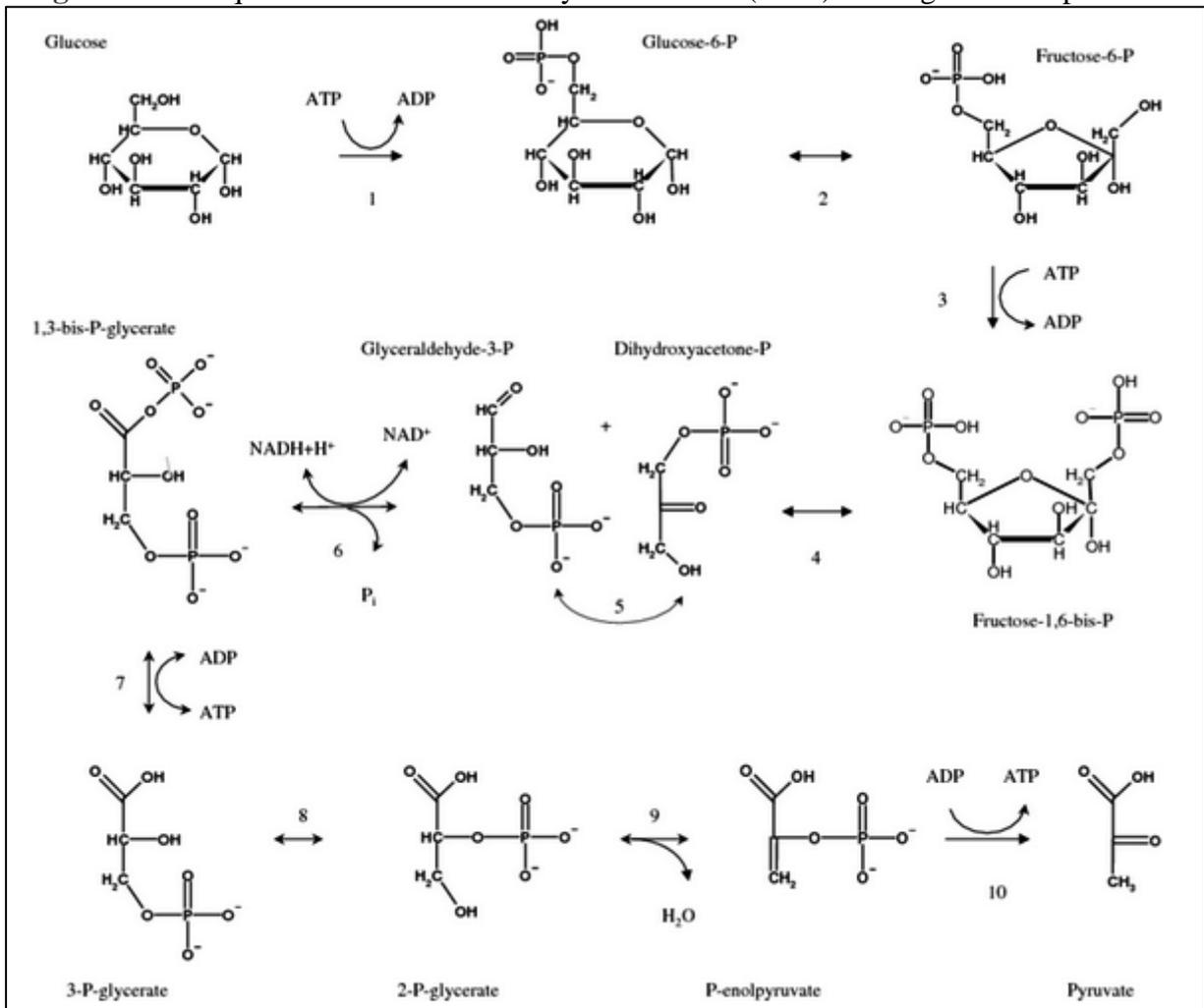
As leveduras são classificadas como fungos unicelulares, característica que as diferenciam dos bolores, com variada distribuição no ecossistema. Elas têm crescimento e reprodução mais rápidos em relação aos fungos filamentosos, sendo metabolicamente mais eficientes quando submetidas a processos de conversão de substâncias químicas devido à sua maior relação área/volume. Quando comparadas às bactérias, as leveduras se apresentam maiores e com propriedades estruturais peculiares, além de apresentarem motilidade reduzida na maior parte dos casos. São células eucarióticas e heterotróficas, possuem uma parede celular rígida e se reproduzem sexuada ou assexuadamente. Leveduras notadamente importantes na indústria de alimentos geralmente se dividem por gemulação ou por fissão com células de diâmetro entre 5 e 8 μm , podendo ser menores em cultivos velhos ou maiores em alguns casos. Crescem com maior facilidade em faixas amplas de pH ácido e toleram concentrações de etanol em torno de 18 % (v/v). A concentração do substrato também interfere no metabolismo das leveduras devido às alterações na pressão osmótica do meio reacional, mas apresentam tolerância à concentração de sacarose, por exemplo, em torno de 55 a 60 % (p/v). Muitas leveduras, a depender do meio em que se encontra, sintetizam pigmentos de variadas cores, além de aromas frutados com potencial de aplicação industrial, mas ainda pouco investigado (JAY, 1992).

Leveduras, vivas ou não, possuem na sua composição uma fração de carboidratos (20 a 40 %) que, em grande parte, fazem parte da parede celular, que é composta principalmente por β -glucanos e mananos, os quais têm impacto no sistema imunológico e a capacidade de prevenir a colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal.

Leveduras do gênero *Saccharomyces*, por exemplo, são classificadas como GRAS (*generally recognized as safe*) e podem ser utilizadas como alimento, como no caso do extrato de levedura, fonte rica de vitaminas do complexo B, além de serem aplicadas como aditivos na produção de alimentos desidratados, tais como sopas, ou na produção de etanol potável e, ainda, produtos de panificação.

O etanol é produzido pelas leveduras seguindo a via glicolítica, Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 1.1), que se caracteriza por uma sequência de reações no citoplasma celular com a conversão da glicose em piruvato.

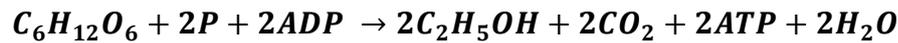
Figura 1.1 – Esquema da via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) desde glicose até piruvato.



Fonte: MAJOR DIFFERENCES.TIFF. 2022. Altura: 519 pixels. Largura: 612 pixels. Proporção renderizada: 204:173. 91,3 kB. Formato TIFF. Compactado. Disponível em: <<https://www.majordifferences.com/2014/01/difference-between-glycolysis-vs-krebs.html?m=1>> Acesso em: 20 jan. 2022.

As leveduras são microrganismos anaeróbicos facultativos e têm comportamento metabólico de baixa ou nenhuma produção de etanol quando o suprimento de oxigênio é suficiente em meios reacionais com restrição de substrato. Nesta condição, a levedura utiliza a fosforilação oxidativa em detrimento da glicólise para obtenção de energia. Contudo, em baixa tensão de oxigênio, o mecanismo é revertido à rápida obtenção de energia pela via glicolítica e posterior síntese de etanol. Todavia, a presença de oxigênio no meio reacional não é fator determinante para a inibição da produção de etanol desde que haja uma concentração de glicose acima de um valor considerado crítico, condição de alta pressão osmótica, dependente da cepa de microrganismo, cujas vias de síntese de enzimas envolvidas na respiração são inibidas. Esse fenômeno é descrito na literatura como Efeito Crabtree, cujos estudos se iniciaram por meio do trabalho de CRABTREE (1928).

Sob baixa tensão de oxigênio ou alta pressão osmótica, causada pela elevada concentração de substrato, o piruvato oriundo da glicólise é reduzido a etanol. O balanço estequiométrico da reação apresenta um rendimento de 51,1 % (m/m) em etanol e 48,9 % (m/m) em CO₂ para a degradação de 1,0 mol de glicose, cujos rendimentos energéticos apresentam a produção de 2,0 moles de ATP, como segue:



Segundo RUSSEL (2003), o glicerol interfere na pressão osmótica do meio e seu acúmulo é importante para a sobrevivência dos microrganismos durante o estresse osmótico. O aumento da temperatura, entre outros fatores de perturbação, faz a célula produzir maiores quantidades de glicerol. Em fermentações industriais para a produção de etanol combustível, a concentração de glicerol pode atingir 15 g/L.

1.2. Catalisadores Químicos

A catálise química tem sido o método de escolha para a produção eficiente de combustíveis para transporte a partir de fontes de carbono fóssil, portanto, é natural que seja o esteio da tecnologia de conversão de biomassa. Muitas das rotas para a transformação da biomassa envolvem várias etapas, incluindo despolimerização seguida por processos de separação e atualização. Os produtos da despolimerização incluem compostos altamente oxigenados e gases leves que são inadequados para uso como combustíveis. Esses materiais precisam ser melhorados por processos distintos. No entanto, as separações necessárias e os produtos residuais das etapas de pré-tratamento aumentam a complexidade e o custo da produção de biocombustíveis. Esses requisitos levaram os pesquisadores a buscar catalisadores heterogêneos que possam converter diretamente a biomassa em combustíveis líquidos (NIELSEN et al., 2008).

Combinar a despolimerização de biomassa e a posterior conversão em líquido por desoxigenação em uma única etapa é particularmente atraente. A transformação de gases leves, tais como gases orgânicos com um a três carbonos, em produtos líquidos também é desejável. Uma função catalisadora adicional é controlar a reatividade de produtos intermediários para evitar a recombinação de moléculas com potencial formação de produtos de alto peso molecular. A conversão direta requer um método para contatar a biomassa com o catalisador pelo uso de solvente ou volatilização por pirólise.

1.3. Enzimas

Enzimas são biocatalisadores ativos que diminuem a energia de ativação das reações sem que sofram alterações químicas permanentes ou desloquem o equilíbrio dessas reações. A ação depende de forças eletrostáticas presentes na molécula; apresentam alta especificidade em decorrência de sua conformação tridimensional com presença de sítios ativos sendo, em muitos casos, dependente de um cofator para que sua ação catalítica se proceda (COPELAND, 2000).

Data de muitos anos a hidrólise enzimática de amido com vistas à produção de etanol. SAMUEL (1996), em seu trabalho de investigação por meio de correlação microscópica, publicou na Revista Science indícios da utilização de amido cru, incrustados em vasos cerâmicos, como substrato para produção de bebidas alcoólicas no Egito Antigo.

Durante o período da Segunda Grande Guerra, muitas pesquisas se voltaram à investigação da possibilidade de produção de etanol e glicose a partir de amido. BALLS, SCHWIMMER (1944) podem ter sido os primeiros pesquisadores a publicar a possibilidade de hidrólise completa de amido do trigo cru com utilização de uma mistura de extratos do pâncreas de porcos e “farelo de mofo”, mais tarde identificado como *Aspergillus oryzae*

As enzimas têm grande potencial na agricultura, processamento de biomassa e produção de biocombustíveis, além de já terem trazido mais eficácia, concomitante à redução de danos ao meio ambiente, em comparação com os processos químicos mais tradicionais. Hoje em dia, cada vez mais enzimas são usadas para melhorar a produtividade da agricultura, melhorar a qualidade do biocombustível e permitir a conversão econômica de biomassa.

As enzimas são, normalmente, proteínas que agem como catalisadores, diminuindo a energia de ativação de reações químicas que, de outra forma, demorariam muito para ocorrer. As reações que quebram as moléculas (como aquelas envolvidas na digestão e respiração celular) e aquelas que constroem moléculas (como as envolvidas na fotossíntese e na replicação do DNA) requerem enzimas. Cada tipo de enzima tem uma forma específica que complementa a estrutura de seu substrato.

A celobiase (EC 3.2.1.21), por exemplo, está envolvida na última etapa do processo de decomposição da celulose, uma molécula formada por longas cadeias de glicose que se encontram nas paredes das células vegetais. Esse é um processo natural usado por muitos

fungos e também por bactérias (como os encontrados no sistema digestório dos cupins, nos estômagos de ruminantes e em compostagem) para produzir glicose como fonte de alimento. Transformar a celulose das plantas em açúcar também é um passo importante na criação de etanol para combustível (CHANDRA et al., 2007).

O substrato natural para a enzima celobiase é a celobiose. Este é um dissacarídeo composto por duas moléculas de beta glicose. Soluções de celobiose (substrato) e glicose (produto) são claras e não existem muitos métodos que conjuguem, simultaneamente, os fatores: simplicidade, baixo custo e celeridade para detectar essas moléculas quantitativamente.

Para tornar essa reação mais fácil de acompanhar, um substrato artificial, o p-nitrofenil glucopiranosídeo pode ser usado. Este substrato artificial também pode se ligar à enzima e ser decomposto de maneira semelhante à celobiose do substrato natural. Quando o substrato artificial, o p-nitrofenil glucopiranosídeo, é decomposto pela celobiase, ele produz glicose e p-nitrofenol. Quando o p-nitrofenol é misturado com uma solução básica conhecida como solução de parada, ele interrompe a reação e torna a solução amarela. A intensidade da cor amarela é proporcional à quantidade de p-nitrofenol presente. Para cada molécula de p-nitrofenol presente, uma molécula de p-nitrofenil glucopiranosídeo é quebrada. Para as reações de celobiase em execução, outra vantagem de usar uma solução básica para desenvolver a cor do p-nitrofenol é que o pH básico também desnatura a enzima e interrompe a reação.

1.4. Cinética Enzimática

O modelo cinético proposto por MICHAELIS, MENTEN (1913), Eq. 1.1, baseia-se numa reação enzimática simples em que são consideradas a velocidade inicial de reação, concentração de substrato inicial, concentração de produto desprezível e existência de um complexo Enzima-Substrato.

$$V = V_{max} \frac{S}{K_M + S} \quad (\text{Eq. 1.1})$$

A determinação das constantes, K_M e V_{max} da equação de Michaelis-Menten pode ser realizada pela técnica de linearização da equação como descrita por Lineweaver-Burk, Eadie-Hanes e Hofstee.

Segundo DORAN (1995), esta técnica acaba resultando em valores pouco precisos, sendo mais adequada à estimativa das constantes pela utilização de softwares. Ainda, grande parte das reações enzimáticas não segue a teoria descrita por Michaelis-Menten, principalmente

devido a problemas com inibições, que podem ser minorados através de correções nessa equação (SCHMIDELL, 2001).

BISPO et al. (2011) fizeram uma extensão do entendimento da solução cinética da Equação de Michaelis-Menten e, por consequência, da Equação de Monod, para ação enzimática sem a necessidade da consideração de restrição pelo estado estacionário e demonstraram a possibilidade de uma solução analítica para essa equação, assim como fizeram Briggs e Haldane, mas sem a dependência do estado estacionário. Em estudos posteriores, BISPO et al. (2013) estudaram a mesma equação com relação à dependência do substrato, sempre considerada em excesso, uma consideração limitadora em aplicações industriais precisas. Nesse trabalho, os autores sugerem uma aproximação matemática para a equação sem a consideração do excesso de substrato. Os autores demonstram o uso de considerações de extensão da reação e simulações numéricas de velocidade da reação e forneceram resultados ainda não obtidos em estudos prévios envolvendo esses aspectos, além de demonstrarem maiores aproximações em relação à utilização de equações empíricas onde se utilizam constantes arbitrárias.

1.5. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

Velocidades de reações enzimáticas dependem da concentração da enzima ativa (Eq. 1.2). Valores da constante cinética K são influenciados pela temperatura segundo a equação de Arrhenius (Eq. 1.3). Logo, a dependência da velocidade de reação com a temperatura pode ser expressa pela Eq. 1.4 (COPELAND, 2000)

$$V = K \cdot [E] \quad (\text{Eq. 1.2})$$

$$K = K_0^* \cdot e^{\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (\text{Eq. 1.3})$$

$$V = V_0 \cdot e^{\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad (\text{Eq. 1.4})$$

Em que:

K : constante cinética, K_0^* : constante cinética hipotética para uma temperatura infinitamente alta, E_a : energia de ativação, R : constante universal dos gases, T : temperatura absoluta.

Todavia, a redução da atividade enzimática em temperaturas mais altas pode não ser desprezível. A enzima, sendo uma proteína, está sujeita à desnaturação, o que pode explicar a redução da atividade da enzima. Geralmente, não há capacidade de renaturação enzimática, o que significa perda definitiva do poder catalisador, sendo ideal o conhecimento das condições

ótimas de estabilidade não só para o armazenamento do produto, como também para minimizar a perda durante um processo.

A cinética de desnaturação é normalmente descrita como uma equação de primeira ordem (Eq. 1.5), muito embora casos mais complexos sejam frequentes. Considerando-se K_d a constante cinética de desnaturação numa dada temperatura, conforme a equação de Arrhenius (Eq. 1.6) e E_d a energia de desnaturação da enzima, pode-se calcular a meia vida da enzima ($t_{1/2}$) pela Eq. 1.7.

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d \cdot T} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

$$K_d = K_d^* \cdot e^{\frac{E_d}{R \cdot T}} \quad (\text{Eq. 1.6})$$

$$\frac{E}{E_0} = 0,5 = e^{-k_d \cdot t_{1/2}} \quad (\text{Eq. 1.7})$$

Assim, considerando-se a velocidade de reação dependente da concentração da enzima ativa e da temperatura (Eq. 1.3 e Eq. 1.4) e se considerando também os efeitos da desnaturação térmica (Eq. 1.5 a Eq. 1.7), obtém-se uma equação global da dependência da velocidade de reação em relação à temperatura (Eq. 1.8 e Eq. 1.9).

$$V = K_0^* \cdot E_0 \cdot \exp\left[\frac{E_a}{R \cdot T} + t \cdot K_d^* \cdot \exp\left(-\frac{E_d}{R \cdot T}\right)\right] \quad (\text{Eq. 1.8})$$

$$V = K_0^* \cdot E_0 \cdot \exp\left[-\frac{E_d}{R \cdot T} + 0,69 \cdot \frac{t}{t_{1/2}}\right] \quad (\text{Eq. 1.9})$$

A atividade enzimática é estável numa faixa limitada de pH porque a enzima possui vários grupos ionizáveis. Mudanças no pH afetam a carga iônica total da molécula, o sítio de interação e a conformação da enzima, essenciais para a manutenção da capacidade catalítica (SHULER, KARGI, 2002).

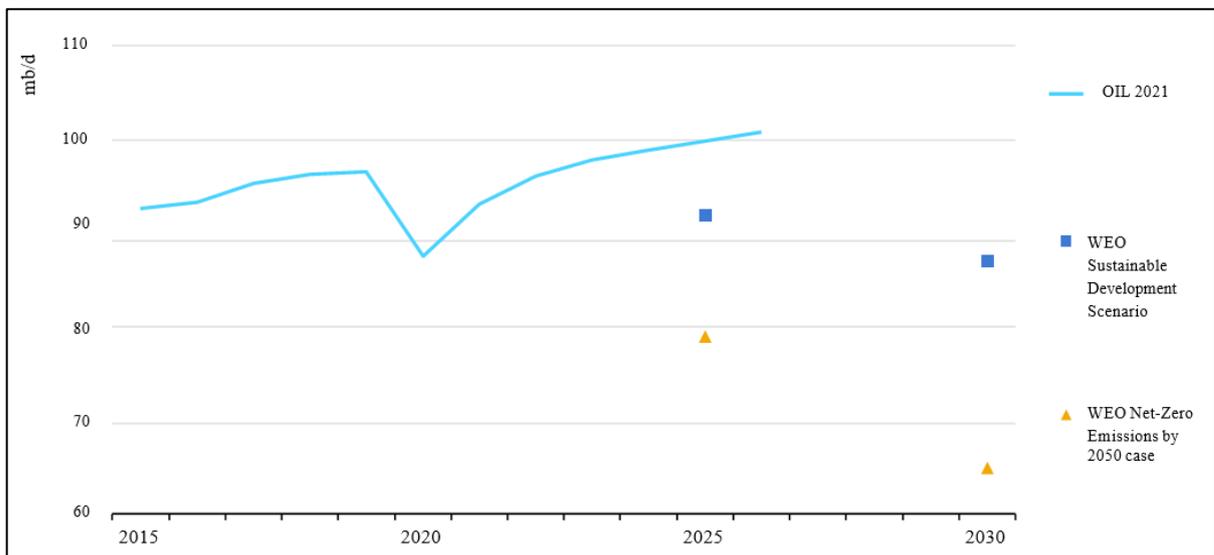
Muitos outros fatores tais como a força iônica do meio, pressão, o tampão empregado, a pureza dos reagentes e da enzima podem afetar a atividade enzimática. Todos estes fatores devem ser experimentalmente determinados ou, no mínimo, escolhidos arbitrariamente e mantidos constantes durante estudos (SHULER, KARGI, 2002).

1.6. O Mercado mundial de combustíveis

Os mercados mundiais de petróleo estão se reequilibrando depois que a crise da Covid 19 gerou um colapso sem precedentes na demanda em 2020, mas podem nunca voltar ao

equilíbrio. Mudanças rápidas no comportamento e um impulso mais forte dos governos em direção a um futuro de baixo carbono causaram uma queda dramática nas expectativas para a demanda de petróleo nos próximos cinco anos (Figura 1.2). Isso está forçando decisões econômicas sofisticadas pelas empresas e países produtores de petróleo, que relutam em deixar recursos inexplorados ou em instalar nova capacidade ociosa, tais como a produção de biocombustíveis ou de enzimas associadas ao processo. A demanda de petróleo poderia atingir o pico mais cedo do que o esperado? Ou o mundo está caminhando de uma crise de abastecimento? Quais serão as implicações para a indústria de refino e os fluxos comerciais?

Figura 1.2—Demanda de petróleo antes e depois da situação de pandemia causada pela Covid-19.



Fonte: IEA, 2021

A Oil 2021, seccional da Agência Internacional de Energia (IEA), aborda essas questões analisando dados do mercado de petróleo, tendências em investimentos e políticas governamentais. O relatório da IEA (2021) fornece uma visão abrangente da oferta e demanda globais até 2026 e explora alguns dos desafios e incertezas que temos pela frente e registra que a demanda de petróleo deve aumentar para 104 milhões de barris por dia (mb/d) até 2026, um aumento de 4% em relação aos níveis de 2019.

O desenvolvimento sustentável da humanidade necessita da produção de energia renovável a custos acessíveis. Os biocombustíveis representam fontes sustentáveis e renováveis de energia que, quando queimadas emitem níveis reduzidos de partículas, óxidos de carbono e óxidos de enxofre e, portanto, prometem ser os combustíveis ideais do futuro para substituir completamente os combustíveis do petróleo. Os biocombustíveis são produzidos a partir de

biomassa das mais variadas fontes. Inovações em biocatálise e processos bioquímicos avançados contribuíram para o lançamento de biorrefinarias utilizando biomassa como fonte de açúcares para a produção de biocombustíveis de segunda geração ou os chamados biocombustíveis avançados. Numerosas abordagens biocatalíticas concentraram-se no uso de açúcares de biomassa para a produção de etanol (TAHERZADEH, KARIMI, 2007; SINGHANIA et al., 2013), butanol (QURESHI et al., 2008a, b) e hidrogênio (ZHANG et al., 2007). Os biocatalisadores permitem o uso de matéria-prima não refinada, incluindo óleo residual, sem a necessidade de separar ácidos graxos livres que podem estar presentes em grandes quantidades na matéria-prima (NIELSEN et al., 2008). Este trabalho pretende trazer uma breve abordagem sobre enzimas com aplicações potenciais na indústria de biocombustíveis, particularmente para a geração de combustíveis de álcool, biohidrogênio e biodiesel. Vários avanços na biocatálise para produção de biocombustíveis foram destacados.

1.7. O Bioetanol

O álcool etílico ou etanol é uma substância orgânica pertencente à classe dos álcoois primários saturados. Pode ser obtido a partir de hidrocarbonetos como eteno e etino e da hulha (carvão mineral) ou por fermentação de carboidratos oriundos da biomassa.

O bioetanol é o gênero que compreende todos os processos de obtenção do etanol em que a matéria-prima é a biomassa, tal como a celulose, a cana-de-açúcar ou o milho, por exemplo.

É provável que a obtenção do bioetanol tenha se iniciado no século VI com a denominação “água ardente”. Como remédio, foi empregado na Itália e regiões setentrionais entre 1250 e 1400. No início do século XIV já se falava da concentração do álcool mediante sais alcalinos, destilação fracionada e refrigeração. Em 1680, Leeuwenhock observou mediante um microscópio, com aumento de 150 vezes, que o agente da fermentação alcoólica (levedura) consistia de pequenos grânulos, assentando a pedra fundamental da investigação dos fenômenos fermentativos (ETHANOL BRASIL, 2007).

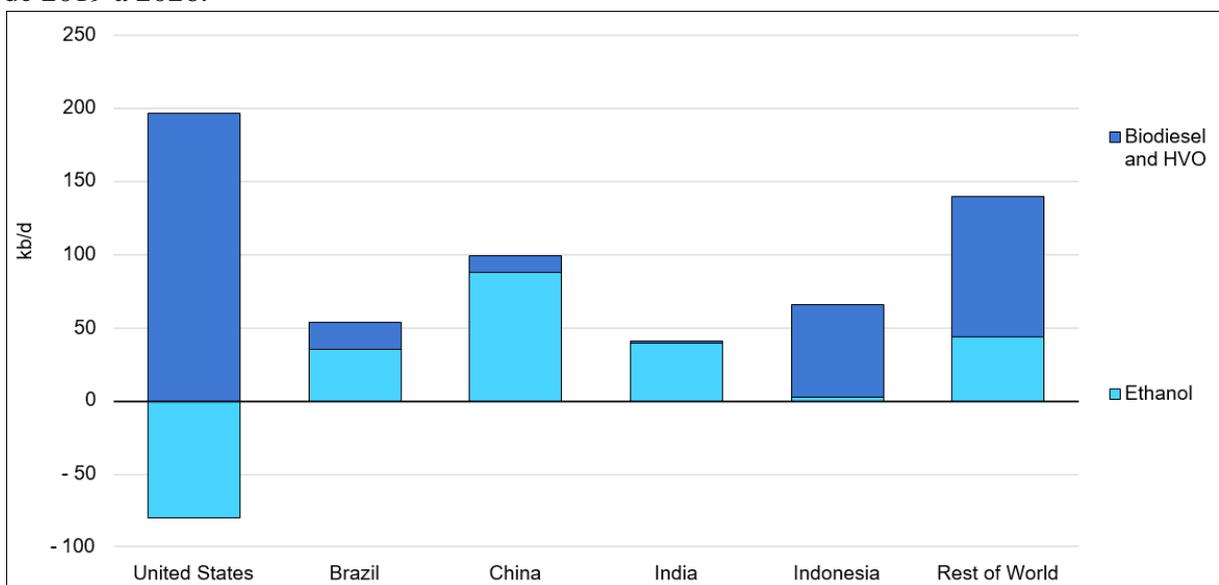
1.8. Energias Renováveis

As energias renováveis, incluindo solar, eólica, hídrica, biocombustíveis e outras, estão no centro da transformação para um sistema de geração de energia com menor grau de impacto na liberação de carbono e maior sustentabilidade.

A bioenergia moderna é uma importante fonte de energia renovável. A sua contribuição para a demanda de energia em todos os setores é cinco vezes maior do que a eólica, a solar e a fotovoltaica combinadas, mesmo quando o uso tradicional de biomassa é excluído. Nos últimos anos, a bioenergia para eletricidade e biocombustíveis de transporte tem crescido rapidamente, principalmente devido aos níveis mais elevados de apoio a políticas. No entanto, o setor de aquecimento, consumidores de oxigênio atmosférico devido à combustão, continua sendo a maior fonte de bioenergia. A bioenergia moderna não inclui o uso tradicional de biomassa, tal como o utilizado em países em desenvolvimento e economias emergentes, que se valem de cozedores e sistemas de aquecimento com fornalhas ineficientes ou queima simples, convergindo em impactos na saúde humana e no meio ambiente (IEA, 2021).

A produção global de biocombustíveis aumentou 10 bilhões de litros em 2018, atingindo o recorde de 154 bilhões de litros. Com o dobro do crescimento de 2017, este aumento anual de 7% foi o maior em cinco anos. A produção deve aumentar 25% até 2024 (IEA, 2021). Os dados são relativos às melhores perspectivas de mercado no Brasil, Estados Unidos e especialmente na China (Figura 1.3).

Figura 1.3— Crescimento da produção de biocombustíveis em mercados chave para o período de 2019 a 2026.



Fonte: IEA, 2021

1.9. A Sustentabilidade na Produção do Bioetanol

O estudo do conceito de energia projetado por ODUM (1988) foi utilizado por BASTIANONI e MARCHETTINI (1996) com relação à produção de etanol a partir da biomassa com foco na eficiência e sustentabilidade do processo. A viabilidade está relacionada

a fatores como: 1 - o combustível produzido deve fornecer mais energia que aquela consumida na sua produção; 2 – o combustível deve ser de fonte renovável e sua disponibilidade por um longo prazo deve ser assegurada; 3 – a liberação de CO₂ no meio-ambiente pela produção e queima do biocombustível deve ser menor em relação à quantidade equivalente de combustível fóssil; 4 – o requerimento de terras não deve ser alto para que se evite a competição com a plantação de outros produtos de maneira que se garanta a preservação de áreas silvestres e o sustento da atividade da biosfera; 5 – a qualidade do combustível deve ser claramente estimada no sistema da hierarquia termodinâmica da biosfera com inserção de custos de produção, incluindo o trabalho ambiental gratuito necessário para provê-lo.

Dados emergéticos analisados para o Brasil em 1996 demonstram que: para análise de energia e carbono, o rendimento para a produção alcoólica a partir de cana-de-açúcar é de $5,92 \times 10^{10}$ J/ha, energia fóssil empregada de $1,36 \times 10^{10}$ J/ha, razão saída/entrada de energia de 4,35, produção líquida de energia de $4,56 \times 10^{10}$ J/ha, liberação de CO₂ de $1,89 \times 10^6$ g/ha, CO₂ evitado pela opção de biocombustível de $4,44 \times 10^6$ g/ha, relação de CO₂ liberado/evitado de 0,43, terra requerida por planta de 0,90 ha; análise emergética: transformidade de $1,03 \times 10^5$ sej/J, razão líquida de energia de 1,62, razão de carga ambiental de 3,27, densidade de ocupação de $6,07 \times 10^{11}$ sej/m² e razão de investimento de 1,61 (BASTIANONI, MARCHETTINI, 1996).

Com a continuidade dos estudos emergéticos sobre a produtividade de etanol de cana-de-açúcar, VITORIA, RODRIGUES (2016) apontam que a produção de cana-de-açúcar no Brasil utiliza níveis relativamente altos de tecnologia, Índice de Carga Ambiental (ELR) para cana-de-açúcar é o segundo mais baixo. Assim, há muito espaço disponível para o desenvolvimento do ponto de vista dominante da agricultura industrializada moderna. A pegada de carbono de um sistema aumenta com o aumento do ELR. Assim, a produção de cana-de-açúcar apresentou melhores resultados do que trigo e milho. Os autores ainda afirmam que a produção de cana-de-açúcar como matéria-prima para etanol no Brasil é mais emergeticamente sustentável que a produção de milho, trigo e mandioca.

1.10. Fatores Agronômicos Associados à Produção do Bioetanol

A produção de álcool, açúcar e cana-de-açúcar pode ser apreciada por meio da Tabela 1.1, fornecida pela UNICA (2021).

Tabela 1.1- Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2020/2021

Estados	Cana-de-açúcar mil toneladas	Açúcar mil toneladas	Etanol (mil m ³)		Total	
			Anidro	Hidratado		
Região Centro-Sul	Espírito Santo	2.655	137	73	38	111
	Goiás	74.011	2.319	1.186	4.055	5.241
	Mato Grosso	16.773	484	935	2.391	3.326
	Mato Grosso do Sul	48.804	1.847	721	2.142	2.864
	Minas Gerais	70.838	4.709	1.047	2.013	3.059
	Paraná	34.790	2.636	531	731	1.261
	Rio de Janeiro	1.083	8	0	74	74
	Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0
	Santa Catarina	0	0	0	0	0
	São Paulo	356.508	26.324	5.195	9.232	14.426
Região Norte-Nordeste	Acre	0	0	0	0	0
	Alagoas	17.036	1.438	190	235	424
	Amapá	0	0	0	0	0
	Amazonas	282	11	0	9	9
	Bahia	4.46	134	117	157	274
	Ceará	0	0	0	0	0
	Maranhão	2.427	15	162	16	178
	Pará	1.036	51	39	12	50
	Paraíba	6.242	144	180	226	406
	Pernambuco	11.827	872	103	255	358
	Piauí	1.177	82	28	10	39
	Rio Grande do Norte	3.068	174	31	86	118
	Rondônia	0	0	0	0	0
	Roraima	0	0	0	0	0
	Sergipe	2.244	118	21	87	108
Tocantins	2.171	0	87	89	176	
Região Centro-Sul	605.462	38.465	9.688	20.675	30.363	
Região Norte-Nordeste	51.970	3.038	959	1.181	2.140	
Brasil	657.433	41.503	10.647	21.856	32.503	

Fonte: UNICA 2021

De modo análogo, observam-se dados relativos à colheita de cana de açúcar na Tabela 1.2, observada em 2018, ano da última atualização promovida pela UNICA (2021).

Tabela 1.2- Área colhida com cana-de-açúcar, 2018

ESTADO	Área em hectares (ha)	
	Plantada	Colhida
Acre	517	455
Alagoas	279.495	279.495
Amapá	246	214
Amazonas	3.962	3.953
Bahia	70.996	70.996
Ceará	12.273	10.013
Distrito Federal	205	205
Espírito Santo	52.242	43.888
Goiás	948.091	948.091
Maranhão	45.399	43.657
Mato Grosso	286.180	283.780
Mato Grosso do Sul	680.611	680.611
Minas Gerais	921.870	917.810
Pará	13.475	13.475
Paraíba	102.424	102.424
Paraná	613.487	613.037
Pernambuco	246.468	244.645
Piauí	14.594	14.594
Rio de Janeiro	53.881	53.876
Rio Grande do Norte	64.240	64.240
Rio Grande do Sul	15.691	15.691
Rondônia	1.907	1.878
Roraima	160	160
São Paulo	5.555.502	5.555.502
Santa Catarina	4.072	4.072
Sergipe	36.457	36.143
Tocantins	39.294	39.294
Região Centro-Sul	9.131.832	9.116.563
Região Norte-Nordeste	931.907	925.636
Brasil	10.063.739	10.042.199

Fonte: UNICA 2021

De acordo com a FAO (2021), prevê-se que a produção global de açúcar na safra entre outubro de 2020 e setembro de 2021 diminua pelo terceiro ano consecutivo, depois que condições climáticas desfavoráveis afetaram negativamente as perspectivas em alguns dos principais países produtores. A produção mundial deverá cair abaixo do consumo global, que deverá se recuperar do nível mais baixo da temporada de 2019 após o início da pandemia de COVID-19.

Em condições climáticas normais, a produção das safras de cana-de-açúcar e beterraba deverá aumentar na próxima década, principalmente por conta de alguns retornos remunerativos. As duas safras de açúcar devem crescer a uma taxa mais elevada do que na década passada, embora bem abaixo das observadas nas décadas entre 1990 e 2000, quando a

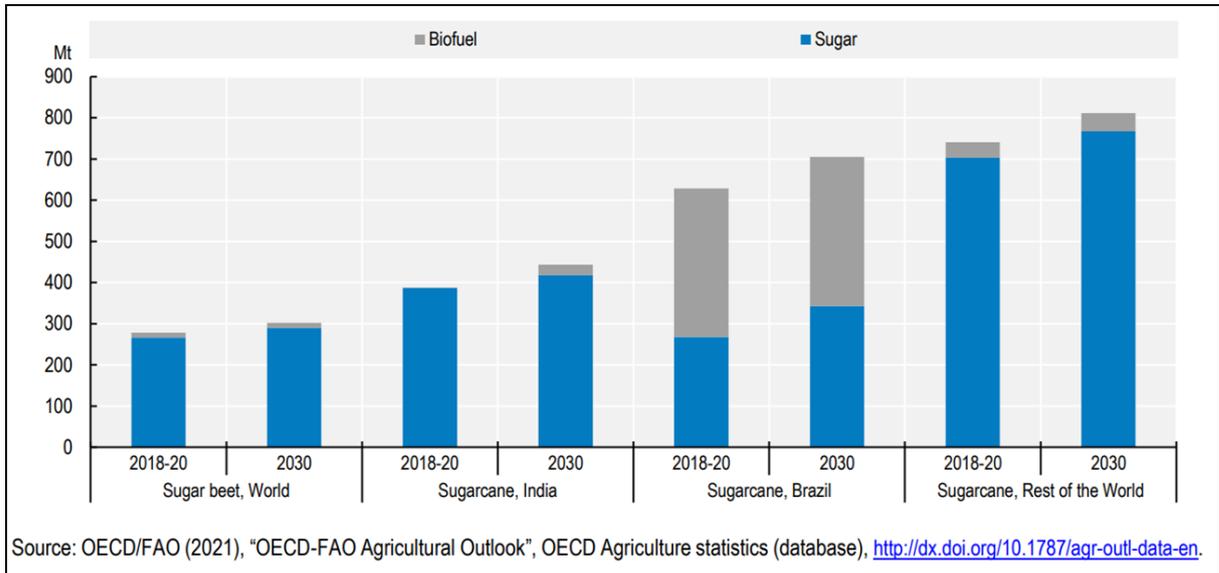
produção de açúcar também era usada para o desenvolvimento de biocombustíveis de primeira geração.

Na próxima década, a partir do ano 2030, o desvio da moagem da safra de açúcar para a produção de etanol - o outro subproduto principal - continuará a desafiar a produção de açúcar (FAO, 2021)

A maior parte do crescimento projetado para a produção de açúcar deverá vir de países em desenvolvimento (Figura 1.4). O Brasil deve manter sua posição como o maior produtor mundial de açúcar, seguido de perto pela Índia. Esses dois países representarão, respectivamente, cerca de 21% e 18% da produção mundial total de açúcar até 2030. Em termos absolutos e em comparação com o período base (2018-2020), Brasil (+5,8 Mt), Índia (+5,1 Mt), e a Tailândia (+3,2 Mt) mostram os maiores aumentos na produção. Na Tailândia, os preços mais altos devem apoiar uma recuperação da produção após duas temporadas consecutivas de produção reduzida (2019 e 2020) devido a uma combinação de condições desfavoráveis de tempo e preços baixos que restringiram o plantio.

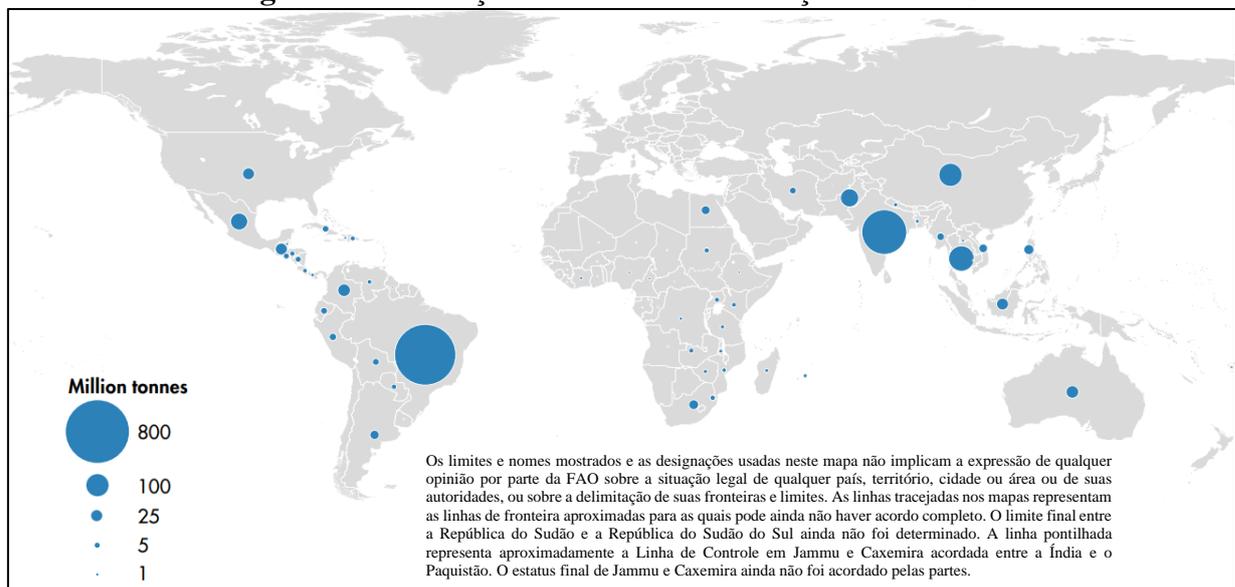
O Brasil, maior fornecedor mundial de açúcar, tem estado persistentemente endividado nos últimos dez anos, mas alguma reestruturação foi iniciada recentemente. Segundo dados da UNICA (2021), ao longo da próxima década, prevê-se que a suposta desvalorização do real aliada a algumas taxas de juro de incentivo contribuam para aumentar a rentabilidade do setor e para atrair novos investimentos, apesar do aumento dos custos dos insumos. Seu setor de açúcar continuará a ser desafiado pelos biocombustíveis, com mais da metade de sua cana sendo usada para produzir etanol. No geral, o domínio do país como o maior produtor e exportador mundial de açúcar será mantido durante o período da perspectiva, com a produção projetada para atingir 41 Mt (+5,8 Mt em comparação com o período base) até 2030.

Figura 1.4 – Dados comparativos entre a produção de biocombustíveis e açúcar para o período de 2018 a 2020 e projeções para o ano 2030.



No ano de 2019, a produção global de cana de açúcar permaneceu preponderante no Brasil, seguido da Índia, tal como pode ser observado na Figura 1.5.

Figura 1.5 – Produção mundial de cana de açúcar em 2019.



Fonte: FAOSTAT. In: <https://doi.org/10.4060/cb4477en-map10>

Por se tratar de uma fonte de combustível renovável, o interesse mundial na questão do bioetanol tomou proporções em que o aprofundamento em pesquisas tornou-se essencial para a diminuição do consumo de combustíveis fósseis, eminentemente esgotável.

A utilização de biocombustíveis diminui os gastos com energia e a emissão de gases tóxicos para a atmosfera, além de despertar um significativo interesse econômico. Seu uso em automóveis reduz em 80 % a emissão de CO₂ na atmosfera (SWISSINFO, 2020).

A indústria madeireira, por exemplo, gera uma carga de rejeitos que podem ser aproveitados para a produção de álcool. OKUDA et al. (2007) trabalharam com produção de álcool a partir de rejeitos de madeira hidrolisado quimicamente com ácido sulfúrico, utilizando *Escherichia coli* KO11 em fermentação anaeróbica e produziram aproximadamente 30 g/L de álcool em fermentadores de 5 L com 90 % de caldo hidrolisado e 5 % de nutrientes. Depois de 48 h de fermentação, a viabilidade celular foi de 10⁸ UFC/mL. O rendimento foi de 0,46 g de etanol/g de açúcar depois de 24 h de fermentação.

O trigo também pode ser uma fonte renovável de biocombustível. Em estudos com trigo, ROSENBERGER et al. (2001) demonstram que o ganho energético líquido pode variar de 27 a 56 GJ/ha e que a produção de etanol pode alcançar valores de 2662 L/ha.

KIM, DALE (2004) comparam dados sobre produção alcoólica a partir de distintos cultivares e demonstram que milho, arroz e cana-de-açúcar apresentam os maiores rendimentos (0,46; 0,48 e 0,50 L/kg de massa seca respectivamente). Aproximadamente 5 % de todo milho produzido no mundo é desperdiçado, o que poderia gerar 9,3 GL de etanol.

Dentre os cultivares destinados à produção de biocombustíveis, destacam-se a cana-de-açúcar e o milho. O rendimento teórico para a produção de etanol a partir da palha de milho seca é de aproximadamente 480 L/ton, assumindo que hexoses e pentoses formados a partir da degradação da celulose original são fermentados (KADAM, MCMILLAN, 2002).

A produção de milho nos Estados Unidos representa 49 % da produção mundial deste cereal e ocupa apenas 20 % das terras destinadas ao seu plantio. Ainda, é o segundo maior cultivar, depois da soja, em que implementações biotecnológicas aumentam consideravelmente o rendimento. Apenas 10 % da área produtora de milho são destinados ao plantio de variedades biotecnológicas (FAO, 2021).

O milho é o grão destinado à alimentação mais produzido nos Estados Unidos, com grande parte da safra destinada à alimentação animal. O milho também é processado em uma ampla gama de produtos alimentares e industriais, incluindo cereais, álcool, adoçantes e subprodutos (USDA, 2021)

A Economic Research Service (ERS), associada ao USDA, fornece dados para a produção de milho que incluem: i) mais de 36 milhões de hectares de terra são plantadas com milho e a maior parte da safra cultivada na região de Heartland; ii) produção de alimentos e sementes para usos industriais são projetados para a demanda anual em curso e em projetos futuros; iii) os Estados Unidos são um importante *player* no mercado de comércio mundial de milho, com exportações entre 10 e 20 % da safra. Os Estados Unidos são responsáveis por cerca de 40 % das exportações mundiais. ERS analisa eventos nos mercados de milho nacionais e globais que influenciam a oferta, a demanda, comércio e preços (USDA, 2020).

SCHOLEY et al. (2016) estudaram a produção de ração animal e combustível a partir de grãos ricos em amido. Os autores relatam que a construção de uma biorrefinaria é um investimento financeiro significativo, requerendo empenho comercial sólido para a produção do produto primário (combustível) e, mais recentemente, dos coprodutos associados, tais como ração animal. Construções modernas de plantas que produzem bioetanol preveem vantagens por meio de economias de escala, na utilização combinada de calor e força e cadeias de suprimentos. Com ampliação de escala e alto volume de produção vem o benefício adicional de fornecimento contínuo e consistência do produto. O uso da tecnologia pode agregar valor ao coproduto e pode adicionar significativo benefício financeiro às biorrefinarias com vistas aos planos de ascensão industrial e de negócios. Os autores concluem que o potencial de uma planta de bioprocessos para produzir tanto combustível quanto ração animal é uma perspectiva excitante. Os avanços tecnológicos no campo das separações físicas e químicas, combinada com a possibilidade de se empregar enzimas, contribui para o portfólio de técnicas de bioprocessos. Os autores ainda apontam que o valor de mercado da proteína está em expansão com expectativa de um aumento de 40 % até 2050. Atualmente, as biorrefinarias de etanol produzem grãos secos como coproduto, que é um valioso ingrediente utilizado principalmente na alimentação do gado bovino.

Segundo a AFDC (2021), com relação à produção de etanol e outros subprodutos do amido, a maior parte do etanol nos Estados Unidos é produzida a partir de grãos com alto teor de amido por processamento seco ou úmido. Quase 90% das usinas de etanol possuem moinhos secos devido aos menores custos. A moagem a seco é um processo de cominuição do milho até farinha. O processo de fermentação a converte em etanol, com geração de subprodutos de destilaria e dióxido de carbono. Plantas industriais de moagem úmida produzem

principalmente xarope de milho, juntamente com o etanol e vários outros subprodutos, tais como óleo de milho e amido.

A maioria das usinas de etanol nos EUA está concentrada no Centro-Oeste, mas o consumo de gasolina é mais alto ao longo das costas leste e oeste. Este fator representa um desafio aos produtores de etanol com relação à distribuição. De acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), 90 % do etanol são transportados por trem ou caminhão. Os outros 10 % são transportados principalmente por barco, com quantidades mínimas transportadas por gasodutos. Para colocar isto em perspectiva, um caminhão-tanque pode transportar 8.000 a 10.000 litros de etanol, e um trem pode transportar aproximadamente 120.000 L de etanol (AFDC, 2021)

De acordo com a Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB, 2021), A estimativa da área a ser cultivada no país para a safra 2021/22 é de 71,8 milhões de hectares, um crescimento de 4,1% em relação à safra anterior. Nesse total estão incluídas as culturas de primeira safra, semeadas entre agosto e dezembro de 2021, as de segunda safra, semeadas entre janeiro e abril de 2022 e as culturas de terceira safra, semeadas entre meados de abril a junho de 2022. A segunda estimativa para a safra que se inicia indica um volume de produção de 289,8 milhões de toneladas, 14,7% ou 37 milhões de toneladas superior ao obtido em 2020/21, com destaque para o aumento na produção da cultura de soja, com crescimento de 3,5% na área a ser cultivada e para o milho, sobretudo o de segunda safra, que foi severamente afetado pela situação climática adversa na safra anterior.

Hoje em dia, o etanol oriundo do milho é produzido quase que exclusivamente do amido retido na semente do grão. Estudos de produção alcoólica a partir de grãos de milho são realizados desde a década de 80 (TORNEY et al. 2007). Avanços e entendimentos mais aprofundados podem, contudo, providenciar aumento significativo no rendimento da produção em detrimento de práticas atuais.

1.11. Leveduras Etanologênicas

Para a produção do bioetanol, pré-tratamentos termoquímicos são utilizados para provocar a ruptura da parede celular do tecido vegetal de maneira que o polissacarídeo se exponha à atuação da enzima. Dentre os procedimentos mais utilizados, o tratamento ácido revela-se eficiente, mas resulta em alta concentração de furfural na fase líquida o que pode

provocar efeito deletério sobre o microrganismo utilizado na fermentação (EGGEMAN, ELANDER, 2005).

ARAQUE et al. (2008) selecionaram cepas termorresistentes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de vinhos para produção de bioetanol a partir de meio contendo 50 g/L de glicose e 100 g/L de material lignocelulósico. As cepas isoladas foram submetidas a estresse térmico de maneira gradual e choque térmico. As cepas consideradas termotolerantes produziram etanol em temperatura de até 42 °C. Quando submetidas à fermentação a 40 °C, a taxa de redução máxima do substrato foi de 75 %. Em etapa simultânea de sacarificação e fermentação a 40 °C, a concentração máxima de etanol foi de 28 g/L enquanto a taxa de redução, 73 %. Em conclusão, os autores afirmam que o estresse térmico tem influência direta na produção de etanol a partir de material lignocelulósico quando são comparadas cepas de leveduras que sofreram o tratamento com outras de mesma cepa sem o tratamento.

KHAW et al. (2005) avaliaram o desempenho de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com base em engenharia de superfície para produção de etanol a partir de amido. A metodologia se baseou em expressão gênica com formação dos plasmídeos com propriedades de expressão para produção de α -amilase e glicoamilase. As leveduras foram crescidas por batelada em meio rico em vitaminas e glicose (20 g/L) com pH 5,0, aeração de 1 vvm e agitação de 400 rpm. Em seguida, foram mantidas em batelada alimentada (alimentação com glicose 30 g/L) nas mesmas condições, mas com meio reacional acrescido de amido (100 g/L). Ao final de 60 h foram observadas a redução da concentração de amido e de glicose para aproximadamente 5,0 g/L e 0,0 g/L respectivamente. A concentração máxima de etanol atingiu o valor de 51,0 g/L com taxa de hidrólise do amido de 95 %.

A produção de etanol a partir da glicose derivada da degradação do amido tem sido dominada pela utilização de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, o açúcar derivado da biomassa é uma mistura de hexoses (essencialmente a glicose) e pentoses (essencialmente a xilose) e muitas cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não degradam a xilose. Uma saída utilizada é a associação de leveduras com microrganismos etanologênicos que degradem a xilose ou a manipulação por engenharia genética com mecanismo de expressão gênica de modo que um só microrganismo degrade tanto as hexoses quanto as pentoses. Para o primeiro caso, pesquisas revelam que é possível a utilização de leveduras e bactérias, como a *Zymomonas mobilis* para a degradação da xilose residual (DIEN et al., 2003); para o segundo

caso, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido manipuladas geneticamente de maneira que tenham a capacidade de degradar ambos os carboidratos pela adição de genes de *Pichia stipitis* (JEFFRIES, JIN, 2004).

O foco de estudos relativos à produção do bioetanol está na redução dos custos tanto da produção dos biorreatores quanto do processo. Para isso, o pré-tratamento se faz necessário e pode representar uma porção significativa na análise de custos. Dessa forma, a compreensão dos mecanismos e operações unitárias envolvidas nas estratégias de pré-tratamentos são essenciais.

Estudos realizados por MAJOVIĆ et al. (2006) revelam que a produção de etanol a partir de farinha de milho hidrolisada por *Saccharomyces cerevisiae* em condições anaeróbicas (pH 5,0; 32 °C e agitação de 100 rpm), liquefeita sob atuação de α -amilase de *Bacillus licheniformis* e sacarificada por glucoamilase de *Aspergillus niger* revelam que o grau de hidrólise do amido nativo presente na farinha de milho depende da concentração do substrato, tipo e concentração da enzima utilizada e as condições em que o processo ocorre. Para uma relação fixa de 1:3 (substrato:água), o que corresponde a 17,5 % de amido, a atividade enzimática de α -amilase é diretamente proporcional à concentração de dextrose equivalente (DE) da farinha de milho hidrolisada (valores de 19 % de DE podem ser alcançados com utilização de 19 KNU de α -amilase depois de 1 h de atuação a 85 °C e pH 6,0). A unidade KNU refere-se ao termo “kilo novo units de α -amilases” – quantidade de enzima que hidrolisa 5,26 g de amido por hora de acordo com a metodologia padrão da Novozyme para determinação de α -amilases). Com o substrato liquefeito, a atuação da glucoamilase se mostra mais eficiente no processo de sacarificação quando a DE atinge valores de 16 % (solução liquefeita), fase em que a DE para a sacarificação atinge aproximadamente 53 % com utilização de 24 AGU de glucoamilase por 4 h a 55 °C e pH 5,0. A unidade AGU é a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 μ mol de maltose por minuto sob condições específicas. Combinações de tratamentos revelaram que a utilização de 12 KNU de α -amilase com 48 AGU de glucoamilase atinge o valor máximo de conversão da farinha de amido (DE=93,8 %) em 48 h. A produção de etanol com a solução sacarificada (12 KNU de α -amilase e 36 AGU de glucoamilase) obteve maior rendimento teórico (89,2 %) com utilização de 11,5 % (p/p) de amido inicial (concentração máxima de etanol de 5,7 %), $Y_{P/S}$ =0,50 e produtividade 1,21 g/L.h. Contudo, a máxima concentração de etanol (7,7 %) foi alcançada com utilização de 17,5 % de amido inicial com rendimento de 78,5 %, $Y_{P/S}$ =0,44 e produtividade 1,60 g/L.h. Para os casos estudados, foi

utilizado inóculo de 1 % (p/p) de *Saccharomyces cerevisiae* em relação à concentração inicial de amido com fermentação etanológica por 48 h a 32 °C e pH 5,0. A concentração do inóculo também se mostra importante na redução do tempo de fermentação, que pode ser de 32 h para concentração de 2 % (p/p).

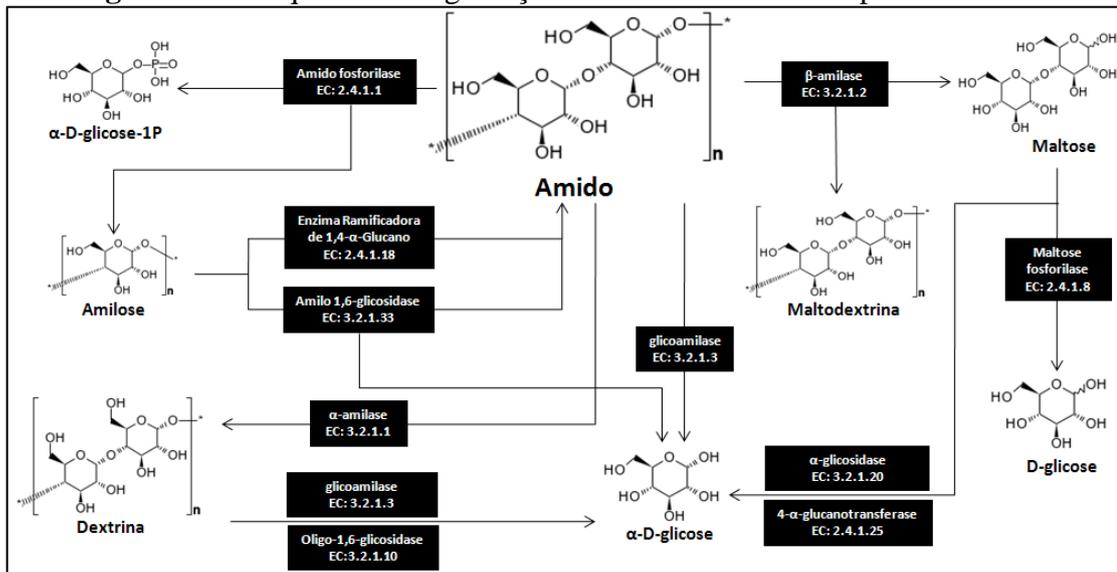
KONDO et al. (2002) realizaram a produção de etanol a partir de amido com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* YF-207 recombinada geneticamente com *Saccharomyces diastaticus* ATCC60712 e *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B com fermentação em batelada simples e batelada alimentada a 30 °C e pH 5,0. No processo em batelada simples, o tempo decorrido para a fermentação com amido como substrato foi de aproximadamente 35 h. A produtividade de etanol foi de 0,71 g/L.h e a concentração atingida, 25 g/L depois de 30 h de fermentação. Em batelada alimentada, a concentração alcançada para o etanol foi de 50 g/L depois de aproximadamente 120 h de fermentação.

1.12. Enzimologia das amilases

A molécula de amido original quando em contato com as amilases, se converte em oligossacarídeos, alterando as propriedades reológicas da solução que o contém até a formação de amilose, dextrina, maltotriose maltose e glicose. O mecanismo de degradação da molécula de amido pelas amilases está representado por meio da Figura 1.6.

Microrganismos inoculados em meios de cultura apropriados segregam quantidades apreciáveis de amilases. Amilases produzidas por microrganismos termofílicos apresentam características termoestáveis em relação àquelas produzidas por mesófilos. Além disso, os processos que ocorrem em altas temperaturas adquirem menor risco de contaminação por mesófilos e a diminuição da viscosidade do meio permite a utilização de elevadas concentrações de substrato. Assim, o processamento industrial do amido requer, essencialmente, enzimas amilolíticas que atuem sob altas temperaturas (UGURU et al., 1997). Por outro lado, enzimas que atuam sob temperaturas amenas, em torno de 30 °C, podem ser bastante úteis para aplicação em indústrias químicas como ingredientes de produtos saponáceos, por exemplo.

Figura 1.6 – Esquema da degradação da molécula de amido pelas amilases.



1.13. Amilases de Origem Bacteriana

Amilases bacterianas, sintetizadas principalmente por *Bacillus subtilis*, são enzimas que liquefazem o amido e que se utilizam na fabricação de adesivos ou de revestimentos à base de amido para papéis, em panificação e em outras indústrias alimentícias ou ainda na fabricação de produtos de desengomagem empregados na indústria têxtil.

A produção de α -amilases com utilização de fontes de amido de baixo custo como trigo, cevada e arroz pode desonerar o processo produtivo de maneira que o torne atrativo a investimentos em larga escala.

IKRAM-UL-HAQ et al. (2005) realizaram testes com *Bacillus licheniformis* GCB-36 e seus mutantes (GCBU-8, GCCM-23 e GCUCM-30) para a produção de α -amilases a partir de fontes naturais de amido como cevada, milho, arroz, grão-de-bico e milheto (“pearl millet”) com fermentação por 48 h a 40 °C e perceberam que a maior atividade enzimática a 60 °C (936 ± 2 IU/mL.min⁻¹) foi alcançada pela espécie mutante GCUCM-30 usando o milheto como fonte de amido. Esta atividade foi ainda maior que aquela observada quando se utilizou amido solúvel (710 ± 5 UI/mL.min⁻¹). Ainda, observaram que concentrações de 1,50 % (p/p) de milheto beneficiam a produção de α -amilases com maiores atividades.

TANYILDIZI et al. (2005) otimizaram a produção de α -amilases de *Bacillus* sp. por meio de superfície de resposta com variações de concentrações de amido (0,0 a 20,0 g/L), extrato de levedura (0,0 a 6,0 g/L), peptona (0,0 a 10,0 g/L) e glicerol (0,0 a 20,0 % - v/v). O maior valor de atividade enzimática (17,54 UI) foi predito pelo modelo com utilização do

método numérico proposto por Meyers e Montgomery. Os valores ótimos com relação aos parâmetros estudados foram: amido, 17,58 g/L; glicerol, 12,37 % (v/v); extrato de levedura, 0,00 g/L e peptona, 8,77 g/L.

Ainda, tratando-se de estudos com utilização de superfície de resposta, ZHI et al. (2005) modelaram matematicamente a purificação de α -amilases produzidas por *Bacillus subtilis* BA-1 em sistema aquoso bifásico com polietilenoglicol (PEG 3350) em forma sólida (variação de 9,0 a 19,0 % - p/p), citrato (variação de 10,0 a 20,0 % - p/p) e NaCl (variação de 0,0 a 10,0 % - p/p). O máximo fator de purificação obtido experimentalmente foi de aproximadamente 2,0 (valor predito pelo modelo matemático de 2,5 – $R^2=0,9234$) com recuperação de 90 % em um único passo de purificação.

DEMIRKAN et al. (2005) trabalharam com *Bacillus amyloliquefaciens* nativos e mutantes na produção de α -amilases. A caracterização da enzima foi realizada após purificação por precipitação com sulfato de amônio 80 %. O precipitado foi dissolvido em tampão Tris-HCl (pH 7,6) e filtrado. Em seguida, foi realizada diálise em coluna de Q-Sefarose e eluição com NaCl 0,5 M no mesmo tampão. Frações foram coletadas e novamente permeadas em coluna de Q-Sefarose seguida de eluição com solução de NaCl 20 mM em tampão pH 5,0. A enzima foi concentrada numa última etapa por ultrafiltração. Peso molecular foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE. As propriedades características das enzimas se mostraram relativamente semelhantes, sobretudo com relação ao pH de atividade máxima (6,0), temperatura (55 °C), peso molecular (52 kDa) e especificidade do substrato (maltopentose). Contudo, no estudo dos parâmetros cinéticos, percebeu-se distinção entre os valores de k_m para as variedades nativas (1,92 mg/mL) e mutantes (3,74 mg/mL). Da mesma forma, foram encontrados valores de $V_{m\acute{a}x}$ de 351 U/mL e 401 U/mL para as variedades nativas e mutantes respectivamente.

Em linha de pesquisa semelhante, MITSUIKI et al. (2005) caracterizaram α -amilases produzidas por distintas variedades de *Bacillus* sp. Todavia, o processo de purificação utilizado se valeu de precipitação seguida de permeação em coluna cromatográfica do tipo DEAE-Toyopearl 650M (2,5 cm x 25 cm) e concentração por liofilização. Nova etapa cromatográfica foi realizada em coluna sephacryl S-200HR (1,0 cm x 20,0 cm). Para *Bacillus subtilis*, a purificação enzimática foi realizada por cromatografias de permeação em gel e troca iônica. De acordo com os resultados obtidos, todos os microrganismos estudados tiveram

capacidade de degradação do amido. Em todos os testes demonstrados, o amido foi degradado mais extensivamente quando se utilizou o milho como fonte de carbono (máximo de 92 % de hidrólise). As colunas cromatográficas utilizadas apresentaram valores de recuperação variando de 9 a 88 % para as espécies *Bacillus licheniformis* IFO14206 e *Bacillus subtilis* IFO3108 respectivamente. A massa molecular analisada variou de 45 a 67 kDa.

Estudos de cromatografia de afinidade de α -amilases produzidas por *Bacillus subtilis* MTCC 1483 em colunas de amido-celite e amido-sepharose seguida de permeação em gel SDS-PAGE foram realizados por MENDU et al. (2005). Os resultados revelaram que a maior atividade enzimática específica alcançada foi de 507,0 $\mu\text{mol/mg}$ com taxa de recuperação de 51,0 % e fator de purificação de 230,0 quando o eluente utilizado foi a dextrina.

1.14. Amilases Produzidas por Fungos Filamentosos e Leveduras

Amilases fúngicas são essencialmente α -amilases provenientes de culturas de bolores, principalmente dos gêneros *Rhizopus* ou *Aspergillus*. Embora apresentem considerável poder de liquefação, amilases bacterianas possuem maior eficiência nesse processo. No entanto, a produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida (NWUFO et al., 1988).

WANDERLEY et al. (2004) caracterizaram bioquimicamente α -amilases produzidas por *Cryptococcus flavus*. O meio fermentado foi centrifugado e liofilizado. A enzima foi então purificada com permeação em gel em coluna Sephacryl S-100 e absorvância de 280 nm e depois por eletroforese em dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE). O maior valor de atividade enzimática obtido com permeação em gel foi de 0,25 U/mL (atividade específica de 842,85 U/mg) em 24 h de incubação, quando se esgotou a fonte de carbono. A atividade enzimática específica obtida com o caldo não purificado foi de 52,22 U/mg. A recuperação em SDS-PAGE foi de 50,21 %. A massa molecular da proteína foi de 84,5 kDa, após permeação em gel, e de 75,0 kDa, quando medida após a purificação por eletroforese. O pH ótimo foi de 5,5, a temperatura de 50 °C e K_M de 0,056 mg/L utilizando-se modelo cinético proposto por Michaelis-Menten.

Estudos relatam que ao se imobilizar α -amilases em colunas com alumina (10 mg de α -amilase para 1g de alumina) sob distintos tratamentos, percebe-se que a enzima é adsorvida somente na superfície externa do suporte (RESHMI et al., 2006). A área superficial utilizada varia de 174 a 241 m^2/g enquanto o volume do poro, de $0,0915 \times 10^{-6}$ a $0,1274 \times 10^{-6}$ m^3/g .

Tratamentos da alumina sob elevadas temperaturas de calcinação podem diminuir grupamentos OH^- na coluna, estabelecendo menor adsorção da enzima (RESHMI et al., 2006).

As α -amilases apresentam atividade enzimática máxima em valores de pH entre 5,0 e 7,0. Fora desta faixa de pH, há queda drástica na atividade por desnaturação proteica. Contudo, α -amilases imobilizadas em alumina apresentam atividades enzimáticas mais pronunciadas quanto se utilizam valores de pH entre 6,0 e 8,0. Todavia, em pH 6,0 tanto enzimas livres quanto imobilizadas apresentam atividade máxima. O efeito da concentração do tampão revela importância significativa na manutenção da atividade enzimática de α -amilases imobilizadas. Para valores de concentração de tampão variando de 0,01 a 0,1 M, quanto maior a concentração, maior será a atividade enzimática. Parâmetros cinéticos estudados com base na cinética proposta por Michaelis-Menten comparam valores para a enzima livre e imobilizada e revelam que os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ variam de $2,51 \cdot 10^{-4}$ a $7,09 \cdot 10^{-4}$ mol/mL e de $1,02 \cdot 10^{-4}$ a $0,99 \cdot 10^{-4}$ mol/mL.min respectivamente (RESHMI et al., 2006).

KARA et al. (2005) estudaram o comportamento de α -amilases imobilizadas em quelante Cu^{2+} poli (etilenoglicol dimetacrilato-n-vinil imidazole) com dessorção em EDTA 25 mM em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. O leito polimérico utilizou área superficial específica de $59,8 \text{ m}^2/\text{g}$. A máxima adsorção ($38,9 \text{ mg/g}$) foi alcançada em pH 4,5, próximo ao ponto isoelétrico da proteína (pH 4,2). Os parâmetros cinéticos foram também comparados segundo modelo de Michaelis-Menten e revelam que os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ para a enzima livre e imobilizada variam de 15,8 mM a 22,5 mM e de 214×10^3 e 234×10^3 U/mg respectivamente. O pH em que se observou maior atividade enzimática foi de, aproximadamente, 5,0 tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada.

1.15. Enzimologia das Celulases

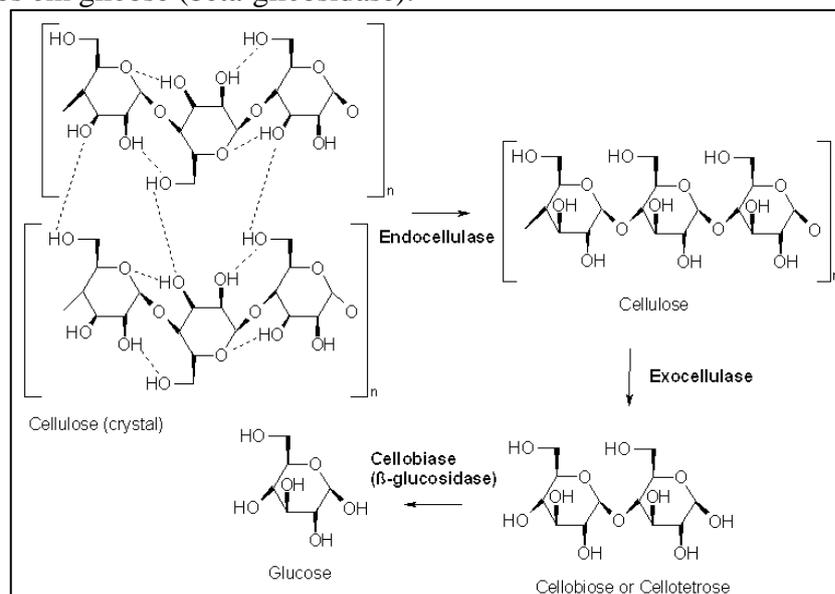
1.15.1. Matéria Lignocelulósica e Produção de Álcool Combustível

Uma quantidade considerável de materiais lignocelulósicos é gerada a partir de agroindústrias e tem recebido atenção crescente da pesquisa como matéria-prima para produtos de alto valor, tais como biocombustíveis, produtos químicos finos de alto valor agregado e fontes de energia baratas (ASGHER et al., 2013). A biomassa lignocelulósica compreende principalmente a rede interligada de celulose (40% – 50%), hemicelulose (20% – 40%) e lignina (20% – 30%); a abundância relativa de cada uma varia, dependendo da fonte (PAULY, KEEGSTRA, 2008). A celulose é um polímero linear de unidades de glicose com ligações β -

1,4 e cadeias agregadas em microfibrilas cristalinas e insolúveis por meio de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals. Açúcares consecutivos ao longo das cadeias são girados em 180° para que a celobiose seja a unidade de repetição. A despolimerização completa da celulose produz glicose (Figura 1.7).

As hemiceluloses comuns são xilana, manana e glucana, sendo as duas últimas mais comuns. As xilanas estão principalmente contidas nas madeiras duras, enquanto as madeiras macias possuem glucomananas. Estes são heteropolímeros com vários graus de ramificação. As xilanas têm unidades de xilose ligadas por β -1,4 com alto grau de acetilesterificações. As glucomananas contêm uma estrutura mista de manose/glicose ligadas por β -1,4 substituída por galactose ligada por α -1,6 e algumas unidades de manose acetilada. A despolimerização das hemiceluloses produz uma mistura de hexoses e pentoses. A lignina, outro componente da lignocelulose, é um heteropolímero relativamente hidrofóbico e aromático que consiste em monolignóis comumente p-hidroxifenil, guaiacil e siringil, álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico que são metoxilados em graus variáveis e formam uma vedação protetora ao redor da celulose e hemicelulose. A abundância relativa desses constituintes varia com as espécies e forma uma rede complexa altamente ramificada e menos reativa (RALPH et al., 2004).

Figura 1.7 – Reações catalisadas pelas celulasas: Quebra das interações não covalentes presentes na estrutura amorfa da celulose (endocelulase) Hidrólise das extremidades da cadeia para quebrar o polímero em açúcares menores (exocelulase) Hidrólise de dissacarídeos e tetrassacarídeos em glicose (beta-glicosidase).



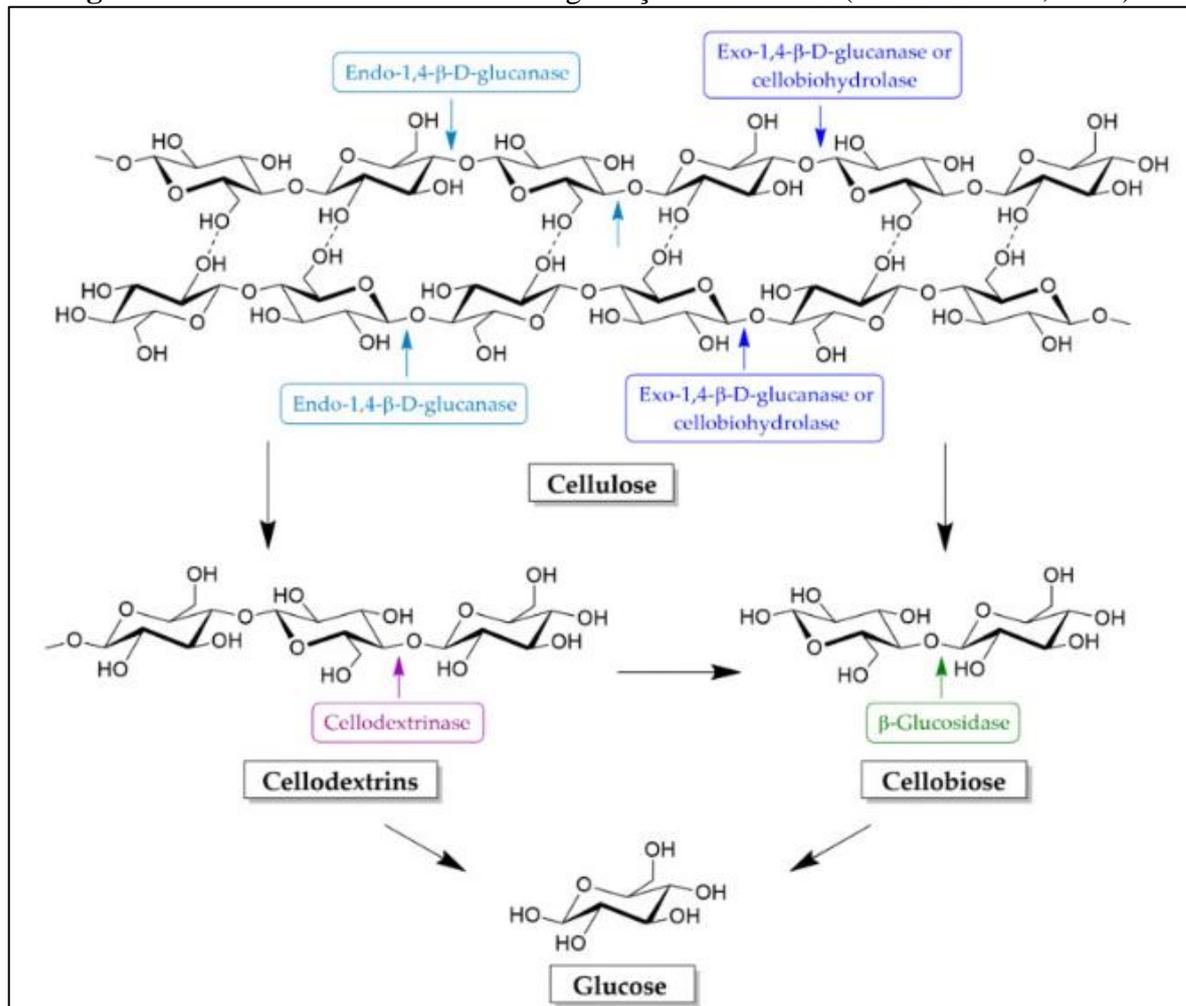
Fonte: BERSERKERBEN. Types_of_Cellulase2.png (761 × 542 pixels, tamanho do arquivo: 5 KB, MIME type: image/png). Compactado. Disponível em: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Types_of_Cellulase2.png> Acesso em: 22 jan. 2022.

Segundo RODRIGUES et al. (2021), a matriz celulose-hemicelulose-lignina é altamente variável e a sua conversão em biocombustíveis requer um processamento em várias etapas destinado a quebrar a barreira da lignina de modo a liberar celulose e hemicelulose que podem ser submetidas à hidrólise enzimática ou modificar a porosidade do material para permitir a penetração da enzima para hidrólise. Um protocolo de pré-tratamento eficaz (físico, químico ou biológico) deve preservar as frações de hemicelulose, produzir açúcares fermentescíveis, limitar a perda de carboidratos, evitar a formação de subprodutos inibitórios, envolver aporte mínimo de energia e ser economicamente eficiente (ASGHER et al., 2013). Os métodos físicos incluem o uso de moinhos de bolas, moinhos de martelo, vapor de alta pressão, pirólise ou irradiação. O pré-tratamento químico com ácidos clorídrico ou sulfúrico diluído ou concentrado enfrenta sérias limitações devido à formação de produtos secundários que podem diminuir o rendimento do açúcar. Álcalis, tais como hidróxido de sódio e amônio, também podem ser usados para o pré-tratamento. Os métodos biológicos de deslignificação empregam bactérias ou fungos para modificar a estrutura e composição da biomassa lignocelulósica (ANWAR et al., 2014).

1.15.2. Degradação de lignoceluloses por meio de enzimas

A degradação da celulose (Figura 1.8) é realizada pela ação sinérgica das três classes de hidrolases juntas referidas como celulase ou enzimas celulolíticas: i) endo- β -1,4-glucanase (endoglucanase, EC 3.2.1.4), que cliva aleatoriamente as ligações internas na cadeia de celulose; ii) exo- β -1,4-glucanase ou celobiohidrolase (exoglucanase, EC 3.2.1.91), que atua na extremidade redutora ou não redutora do polímero de celulose e a iii) β -glicosidase (β -D-glicosídeo glucanahidrolase, EC 3.2.1.21), que converte a celobiose em glicose (CHANDRA et al., 2007). As celulases são algumas das enzimas mais utilizadas industrialmente e se tornariam as enzimas industriais de maior volume, caso o etanol ou o butanol se tornassem os principais combustíveis de transporte (WILSON, 2009).

Figura 1.8 – Enzimas envolvidas na degradação da celulose (KUMLA et al., 2020).



As enzimas hemicelulolíticas são mais complexas e envolvem endo- β -1,4-xilanase, exo- β -1,4-xilanase, endo- β -1,4-mananase, β -manosidase, acetil xilano esterase, α -glucuronidase, α -arabinofuranosidase e α -galactosidase. Várias espécies de bactérias, como *Acetivibrio*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Erwinia*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus* e *Streptomyces* e fungos, como *Fusarium*, *Humicola*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Trichoderma* e *Schizophyllum* são conhecidos por produzirem celulases. FISCHER et al. (2014) identificaram preparações brutas de celulase de *Aspergillus niger* e *Mucor racemosus* como potenciais candidatos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para posterior produção de etanol.

A lignina é o principal componente da parede celular vegetal que contribui para a variabilidade da biomassa e, conseqüentemente, aumenta o custo associado à conversão da lignocelulose (YADAV et al., 2022). Os métodos atuais de deslignificação incluem o tratamento com solventes orgânicos, líquidos iônicos, expansão da fibra de amônia ou

hidrotermólise, que são dispendiosos e aumentam o custo geral do processo. Assim, aumentar a eficiência e diminuir o custo do pré-tratamento são a prioridade. Os fungos da podridão-branca produzem peroxidases e lacases para gerar moléculas reativas que, subsequentemente, degradam a lignina (MARTINEZ et al., 2005). A análise do genoma de *Phanerochaete chrysosporium* revela centenas de enzimas de degradação da lignina codificadas em clusters no genoma (VANDAN et al., 2006). Os cupins, por exemplo, são capazes de digerir completamente a hemicelulose em acetato e hidrogênio molecular.

A hidrólise da celulose produz hexoses, enquanto as hemiceluloses formam pentoses que podem ser fermentadas usando sacarificação e cofermentação simultâneas por microrganismos capazes de utilizar açúcares de seis e cinco carbonos, respectivamente. A hidrólise e a fermentação também podem ser realizadas simultaneamente usando microrganismos geneticamente modificados, que podem fermentar hexoses e pentoses nos mesmos meios em que as enzimas hidrolíticas de celulose e hemicelulose estão presentes, tornando o processo economicamente favorável (HODAIFA et al., 2022).

Bactérias homoacetogênicas, hidrolisadoras de hexoses e pentoses, simultaneamente, produzem ácido acético, que pode ser esterificado para produzir acetato de etila, relativamente insolúvel. O acetato de etila pode ser facilmente recuperado do caldo e hidrogenado para produzir 2 moles de etanol. Portanto, 1 mol de hexose produz 3 moles de etanol, resultando em melhor rendimento. QURESHI et al. (2008a) demonstraram a produção de butanol a partir da fibra de milho hidrolisada com celulase e celobiase. A produção de butanol em fermentação descontínua usando palha de trigo hidrolisada por celulase, β -glucosidase e xilanase também foi relatada (QURESHI et al., 2008b). A palha do trigo é composta por 35 % - 45 % de celulose, 20 % - 30 % de hemicelulose e um conteúdo de lignina relativamente baixo de cerca de 20 %, o que torna sua bioconversão em biocombustíveis particularmente atraente. Outros pesquisadores também relataram o uso de palha de trigo como um substrato potencial para vários processos de bioconversão. A adição de surfactantes durante a hidrólise foi descrita para modificar as propriedades de superfície da celulose e diminuir a carga enzimática. Surfactantes não iônicos como Tween 20, Tween 80 e polietilenoglicol foram considerados particularmente eficazes na melhoria do processo de hidrólise, revertendo a adsorção não produtiva de celulase em lignina (BÖRJESSON et al., 2007). A escolha do surfactante é um parâmetro crítico que pode ter um efeito negativo na fermentação do hidrolisado (TAHERZADEH, KARIMI, 2007).

Coquetéis de celulase disponíveis comercialmente são geralmente derivados do fungo *Hypocrea jecorina* (anamorfo da *Trichoderma reesei*) (HORN et al., 2012) ou *Aspergillus niger* (CAI et al., 2022). A enzima tem pH ótimo entre 4,5 e 5,0 e temperatura ótima entre 40 °C e 50 °C. Embora essas preparações mostrem um potencial de degradação razoavelmente bom, a principal desvantagem das celulases de *Trichoderma* são os níveis subótimos de β -glicosidases. No entanto, as espécies de *Aspergillus* são boas produtoras de β -glucosidase. A eficiência hidrolítica das celulases de *Trichoderma* pode ser melhorada com a suplementação de β -glicosidases (SUKUMARAN et al., 2009). WEN et al. (2005) sugeriram o co-cultivo de *T. reesei* e *Aspergillus phoenicis*. NAKAZAWA et al. (2012) construíram uma cepa recombinante de *T. reesei* expressando β -glucosidase de *Aspergillus aculeatus*. Foi relatado que as cepas de *Acremonium cellulolyticus* produzem não apenas celulase e β -glucosidase, mas também enzimas que degradam a carboximetilcelulose e uma pequena quantidade de xilanase, β -1,3-glucanase e amilase. GUSAKOV (2011) revisou as fontes potenciais de celulase como alternativas ao *T. reesei*. A expressão da celulase em microrganismos é induzível e repressível. LV et al. (2015) desenvolveram um sistema de expressão responsivo a cobre com base no gene transportador de cobre *tcu1* de *T. reesei* e alcançaram uma expressão constitutiva de celulase em meio não indutível contendo glicose. Em momento posterior, a produção de enzima celulolítica melhorada foi relatada em *Penicillium oxalicum* pela manipulação de genes com o objetivo de amplificar a expressão gênica e aliviar a repressão (YAO et al., 2015).

A hidrólise enzimática pelas celulases é realizada a temperaturas abaixo de 50 °C, mas as taxas de hidrólise reduzidas, baixo rendimento de açúcar, alta dose de enzima necessária e suscetibilidade à contaminação microbiana são algumas limitações que podem ser superadas usando biocatalisadores termofílicos (BHALLA et al., 2013). Vários termófilos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Acidothermus*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Thermotoga*, *Anaerocellum*, *Rhodothermus*, *Caldicellulosiruptor*, *Sporotrichum*, *Scytalidium* e *Thermomonospora* são relatados para produzir celulases termoestáveis (KUMAR et al., 2015). Endoglucanases termoestáveis de *Bacillus subtilis* (YANG et al., 2010), *Fervidobacterium nodosum* (WANG et al., 2010) e *Thermoanaerobacter tengcongensis* (LIANG et al., 2011) foram clonadas e expressadas em *Escherichia coli*.

REESE et al. (1950) sugeriram a necessidade de um componente não hidrolítico para a hidrólise da celulose que pudesse interromper o empacotamento do polímero no

substrato, aumentando sua acessibilidade para enzimas hidrolíticas. MOSER et al. (2008) mostraram que o módulo de ligação de carboidratos (MLC33) de *Thermobifida fusca* potencializa a hidrólise da celulose catalisada pela celulase. Em 2011, CelS2, um MLC33 de *Streptomyces coelicolor*, foi relatado para clivar celulose produzindo ácidos aldônicos, e a atividade de CelS2 foi inibida por EDTA e restaurada por íons divalentes. Mais tarde, essas proteínas mostraram ser monooxigenases dependentes de cobre (HORN et al., 2012).

Muitos fungos produzem glicosil hidrolases (GH61) que são estruturalmente semelhantes ao MLC33 e agem sinergicamente com as celulases (HARRIS et al., 2010). Foi demonstrado que estes catalisam a clivagem oxidativa da celulose na presença de doadores de elétrons externos como ácido gálico, ácido ascórbico e glutathiona reduzida (QUINLAN et al., 2011) e também foram descritos como monooxigenases polissacarídeo lítico dependentes de cobre (HORN et al., 2012). Foi proposto que essas monooxigenases apresentem sítios de ligação de substrato planos, que se adaptam bem a superfícies de celulose cristalina, onde podem interromper o empacotamento e aumentar a acessibilidade do substrato às hidrolases (HORN et al., 2012). Estas novas monooxigenases mostraram acelerar a conversão enzimática, reduzindo assim os tempos de processamento e a taxa de carregamento da enzima. A swollenina, outra proteína semelhante à expansina encontrada em vários fungos celulolíticos, também rompe as ligações de hidrogênio na celulose nativa, facilitando a ligação enzimática (CHEN et al., 2010).

A degradação da celulose por uma combinação de celulases e oxigenases produz açúcares oxidados que podem evitar o problema de inibição do produto. O ácido celobiônico é conhecido por apresentar menos efeitos inibitórios sobre a celulase em comparação com a celobiose. No entanto, o ácido celobiônico é hidrolisado com maior dificuldade por β -glucosidases e o ácido glucônico, resultante da hidrólise, mostra uma inibição pelo produto mais forte do que aquela observada em relação à glicose (CANNELLA et al., 2012). No entanto, o ácido glucônico pode ser fermentado diretamente em etanol usando cepas adequadas (FAN et al., 2012).

1.15.3. Fatores que afetam a hidrólise enzimática da lignocelulose

Os principais fatores que afetam a hidrólise da lignocelulose podem estar relacionados à enzima ou ao substrato e incluem principalmente a concentração e a qualidade do substrato, o método de pré-tratamento empregado, as características da enzima e as

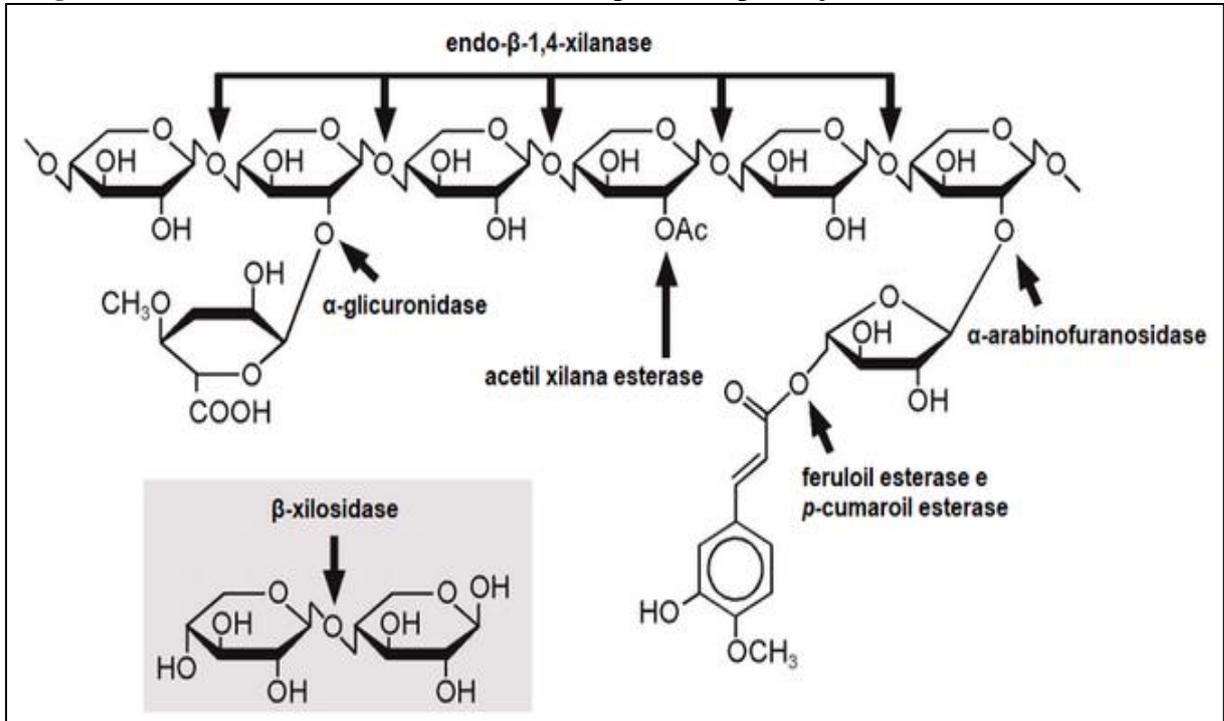
condições de hidrólise. O pH e a temperatura ideais são funções da matéria-prima, fonte da enzima e tempo de hidrólise. A concentração do substrato é um fator importante que rege o rendimento e a taxa inicial de hidrólise. A alta concentração de substrato afeta a transferência de massa, resulta na inibição da enzima e, subsequentemente, reduz os rendimentos. A razão entre as concentrações de substrato e enzima é outro fator importante que rege a taxa e a extensão da hidrólise (SUN, CHENG, 2002). Combinar a hidrólise enzimática de lignocelulósicos e subsequente fermentação em uma única etapa é um dos métodos mais bem-sucedidos de produção de etanol que permite o consumo simultâneo de açúcares sendo hidrolisados, mantendo assim a baixa concentração de açúcar em todo o processo, o que minimiza os efeitos de inibição (SUN, CHENG, 2002). No entanto, para hidrólise e fermentação simultâneas, as condições ideais precisam ser as mais próximas possíveis e, uma vez que a hidrólise é geralmente realizada em temperaturas elevadas, o emprego de microrganismos termotolerantes para a fermentação oferece uma vantagem (TAHERZADEH, KARIMI, 2007). Alternativamente, a sacarificação e fermentação não isotérmicas simultâneas podem ser realizadas em reatores separados, cada um operando em diferentes temperaturas (WU, LEE, 1998).

As técnicas de engenharia genética possibilitaram um bioprocessamento consolidado que combina a degradação e a fermentação da celulose em uma única etapa, criando cepas de leveduras que degradam a celulose. Estas cepas, com expressão superficial de endoglucanase e exoglucanase de *T. reesei* e β -glucosidase de *As. Aculeatus*, foram projetadas (WEN et al., 2010). Células de levedura modificadas, que expressam celulasas na superfície celular exibem melhor potencial de hidrólise. TSAI et al. (2010) purificaram celulasas de *Clostridium thermocellum* CelA e BglA e *Clostridium cellulolyticum* CelE e CelG de *E. coli*. BAEK et al. (2012) demonstraram a produção de etanol a partir de celulose entumescida com ácido fosfórico, combinando três tipos de células de levedura recombinantes, expressando potencial de formação de endoglucanase EGI de *T. aurantiacus* endoglucanase, exoglucanase CBHII de *T. reesei* e β -glucosidase BGLI de *As. aculeatus*, respectivamente, em vez de co-expressar essas enzimas em uma única célula. Este sistema permite a otimização da produção de etanol, ajustando a proporção relativa de diferentes tipos de células. Os pesquisadores alcançaram produção de etanol 1,3 vezes maior com razão EGI / CBHII / BGLI de 6: 2: 1 em comparação com a concentração equimolar de cada tipo de célula.

1.15.4. Xilanases e degradação de xilana

A hidrólise enzimática completa da hemicelulose requer ação sinérgica de várias enzimas (Figura 1.9). Endo- β -1,4-xilanase cliva resíduos de xilose ligados a β -1,4 na estrutura de xilanas. A β -1,4-xilosidase libera monômeros de xilose e a α -glucuronidase cliva o ácido o-metil- α -glucurônico das extremidades não redutoras dos xilo-oligossacarídeos. A α -L-arabinofuranosidase remove as cadeias laterais de arabinose da estrutura da xilose de arabinoglucuronoxilana. Essas arabinoglucuronoxilanas são tipicamente acetiladas nas posições o-2 e o-3 da cadeia de xilose e, frequentemente, têm grupos ácido ferúlico ou ácido cumárico esterificados em grupos 5'OH arabinofuranosil, que podem ser hidrolisados por esterases. A acetil xilano esterase e a feruloil esterase produzem xilo-oligossacarídeos de substituição curtas com liberação concomitante de ácido ferúlico e ácido acético. Os xilo-oligossacarídeos substituídos sofrem ação da arabinofuranosidase e da glucuronidase que liberam arabinose e ácido glucurônico e formam xilo-oligossacarídeos lineares não ramificados que podem ser acionados pela xilosidase. Os resíduos de xilose liberados podem ser prontamente fermentados em etanol (DODD, CANN, 2009).

Figura 1.9 – Estrutura de xilana com sítios específicos para ação das enzimas xilanolíticas.



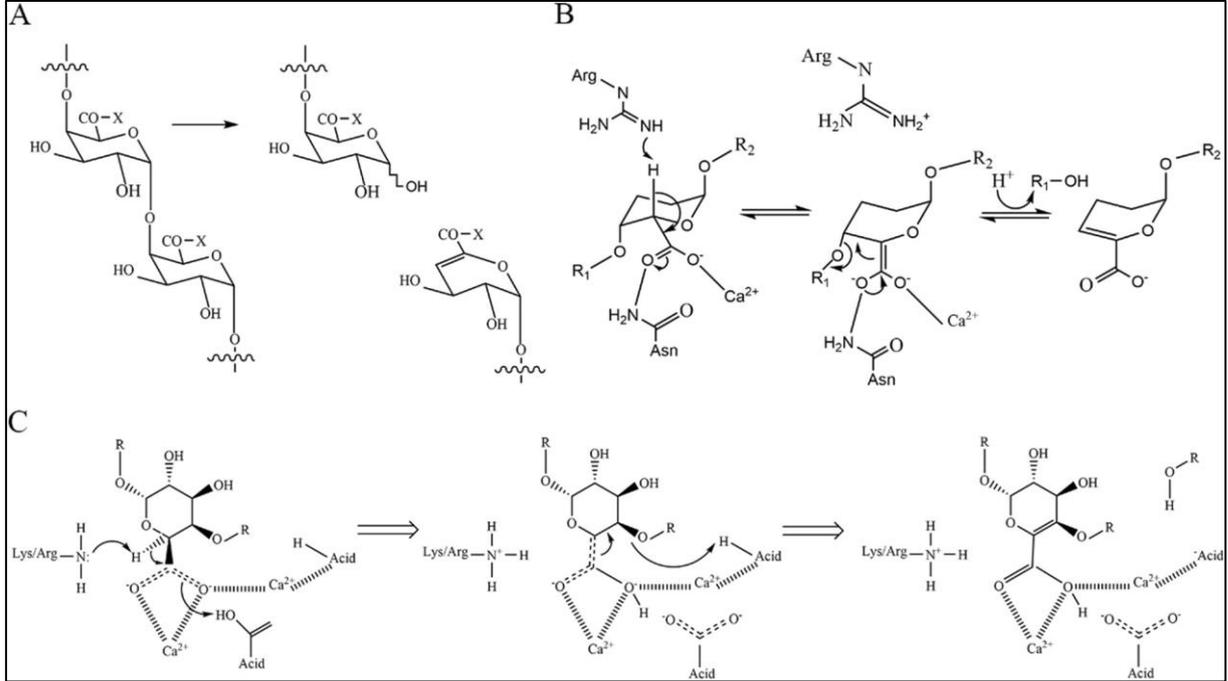
Fonte: Bioquímica Brasil, 2018. (611 × 318 pixels, tamanho do arquivo: 5 KB, MIME type: image/png).
 Compactado. Disponível em:
https://static.wixstatic.com/media/9aa4b9_c32b6683eed04e18b297bfca2bf565f1~mv2.png/v1/fill/w_671,h_350/9aa4b9_c32b6683eed04e18b297bfca2bf565f1~mv2.png. Acesso em: 27 fev. 2022.

As enzimas que degradam a xilana são produzidas por fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários, crustáceos, caracóis e insetos. As xilanases termoestáveis são produzidas por uma série de fungos, a saber, *Laetiporus sulphureus*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Nomura flexuosa*, *Thermoascus aurantiacus* e *Rhizomucor miehei*, e bactérias, tais como *Bacillus*, *Geobacillus*, *Thermotoga*, *Acidothermus*, *Cellulomonas*, *Paenibacillus*, *Thermoanaerobacterium*, *Actinomadura*, *Alicyclobacillus*, *Anoxybacillus*, *Nesterenkonia* e *Enterobacter* (BHALLA et al., 2013). As xilanases bacterianas têm temperatura ótima e termoestabilidade mais altas e, portanto, são preferidas às xilanases fúngicas, mas seu baixo nível de expressão limita seu uso, o que pode ser aprimorado por clonagem e superexpressão. Os fungos filamentosos produzem várias xilanases em seu sistema de celulase. INOUE et al. (2015) expressaram endo- β -1,4-xilanase de *Talaromyces cellulolyticus* e relataram que a combinação do MLC contendo celulases e xilanases poderia contribuir para a redução da carga enzimática na hidrólise de lignoceluloses pré-tratadas. Um gene que expressa produção de xilanase, oriundo de *Geobacillus* sp. (WU et al., 2006) e de *Actinomadura* sp. (SRIYAPAI et al., 2011) foi clonado e expresso em *E. coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente.

1.15.5. Pectinas e enzimas pectinolíticas

As pectinas são os componentes estruturais das paredes celulares das plantas, abundantes principalmente na polpa de beterraba, maçã e frutas cítricas, onde constituem cerca de 50% do conteúdo polimérico da parede celular. As propriedades estruturais das paredes celulares sugerem que as pectinas podem mascarar a celulose-hemicelulose, bloqueando sua exposição às enzimas hidrolíticas. A pectina tem a estrutura principal do ácido homogalacturônico com cadeias laterais neutras de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. As enzimas que degradam a pectina (Figura 1.10) incluem polimetilgalacturonase, endopoligalacturonase, pectinase, exopoligalacturonase e exopoligalacturanosidase que hidrolisam o polímero de pectina; α -L-ramnosidase, que hidrolisa ramnogalacturonano; α -L-arabinofuranosidase, que hidrolisa as cadeias laterais de L-arabinose; endoarabinase, que atua nas cadeias laterais de arabinano na pectina; e pectina-liase, pectato-liase e pectato-dissacarídeo-liase, que clivam o polímero de ácido galacturônico por β -eliminação (JAYANI et al., 2005). Materiais ricos em pectina têm baixo teor de lignina, o que os torna substratos atraentes para a produção de bioetanol (XIAO, ANDERSON, 2013).

Figura 1.10- Mecanismo catalítico de β eliminação de poligalacturonato liase (PGLs) e polimetilgalacturonato liase (PMGLs). A. Modo de ação em PGLs e PMGLs (X: $-\text{O}-$, o substrato é pectinato, X: $-\text{O}-\text{CH}_3$, o substrato é pectina); B. Mecanismo catalítico de β eliminação assistido por Ca^{2+} ; C. Mecanismo catalítico comum de β eliminação em PGLs e PMGLs (Lys/Arg como base catalítica). Fonte: ZHENG et al., 2021.



1.16. Materiais e Métodos

1.16.1. Modelagem matemática

Na presente investigação, os dados experimentais foram propostos para serem ajustados usando a seguinte função de ajuste de Boltzmann (B):

$$B = \sum_{i=1}^{n-1} f_i (y_{i+1} - y_i) + y_n \quad (\text{Eq. 1.10})$$

onde y i -th são os dados experimentais, n é o número total de pontos experimentais e f_i corresponde à fração relativa de espécies, dada por

$$f_i = \frac{1}{1 + \exp((x_T - x_m(i))/\tau)} \quad (\text{Eq. 1.11})$$

Aqui, x_T é a variável independente teórica da propriedade y , τ é o coeficiente de transição, $x_m(i)$ é o ponto médio definido como:

Para $i = 1$ até $n-1$

$$x_m(i) = X(i) + (X(i+1) - X(i))/2 \quad (\text{Eq. 1.12})$$

de modo que X é a variável independente experimental

Para demonstrar a aplicabilidade da função B, considere um dado experimental hipotético onde $y = [1; 1,5; 3,8; 6; 4,5; 2,5]$ e $X = [1; 2; 3; 4; 5; 6]$, conforme mostrado na Figura 1.11. Neste caso, $n = 6$, $x_m = [1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5]$. Se quisermos que a função B tenha 50 pontos, por exemplo, podemos usar o seguinte código para obter x_T :

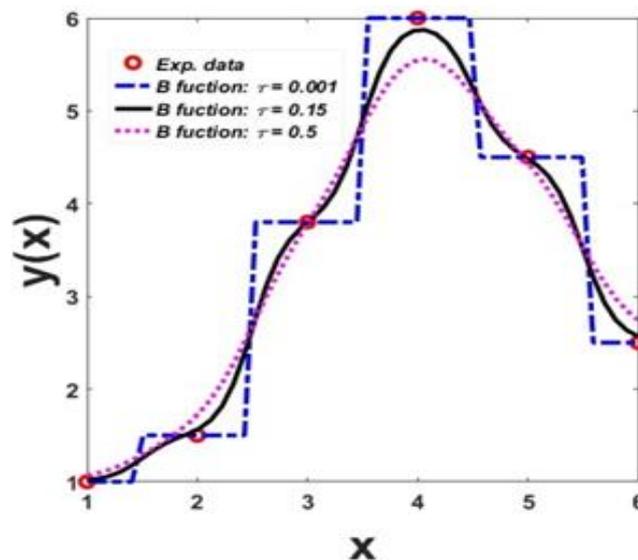
$$x_i = X(1) = 1$$

$$x_f = X(6) = 6$$

Para $j = 1$ até 50

$$x_T(j) = x_i + (x_f - x_i) * (j-1) / (50-1)$$

Figura 1.11 – Dados experimentais hipotéticos.



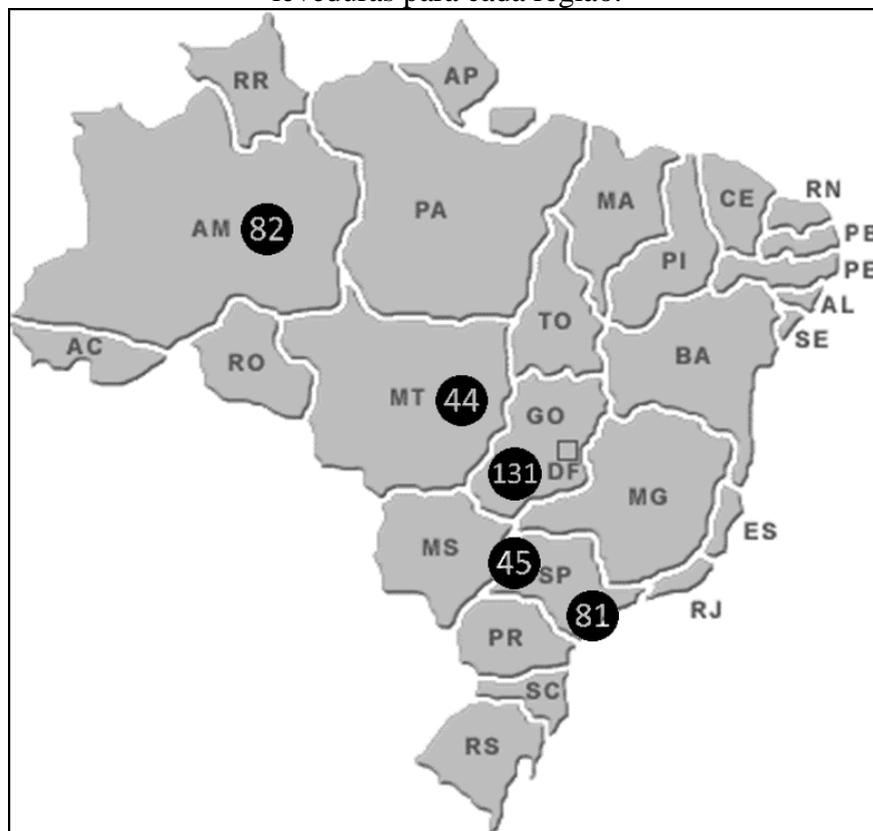
Visto que temos, n , x_T e x_m , o único parâmetro desconhecido da função B é o coeficiente de transição (τ). Assim, na Figura 1.11 podemos observar os resultados obtidos para esta função utilizando os dados anteriores em valores distintos de τ . Como pode ser observado nesta figura, os valores reduzidos de τ ($\tau = 0,001$) levam a função B a descrever uma função degrau que passa pelos dados experimentais com ponto de inflexão nos valores $x_m(i)$. À medida que τ aumenta, uma expressão teórica mais suave dos dados experimentais pode ser obtida ($\tau = 0,15$ e $0,5$) e em valores altos esta função tende a expressar o valor médio dos dados y . Nesta visão, pode-se usar este procedimento para obter curvas diferenciáveis aproximadas

para caracterizar quaisquer dados experimentais apenas definindo o valor do coeficiente de transição (τ).

1.16.2. Coleta e isolamento dos microrganismos oriundos do Laboratório de Engenharia Metabólica e Bioprocessos (LEMeB/Unicamp)

HERNALSTEENS (2006) obteve amostras em diferentes regiões do Brasil (Figura 1.12) de pólen de flores, frutos (em perfeito estado de maturação) e solo, entre outros, que foram coletados em sacos plásticos ou tubos estéreis, e mantidos a 4 °C por no máximo três dias.

Figura 1.12 – Regiões em que foram coletadas as amostras com respectivos números de leveduras para cada região.



Seguindo a metodologia de CHEN, LIU (1996), as culturas acima foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (500 mL). Posteriormente, estas culturas foram diluídas convenientemente para plaqueamento (cultivo em placas de Petri) com meio padrão. Para a inibição de bactérias, quando necessário, foram adicionados 50 ppm de ácido nalidíxico e ampicilina, após esterilização e resfriamento do meio (CASTRO, 1995). As colônias isoladas foram repicadas em ágar inclinado GYMP, incubados a 30 °C, até desenvolvimento, para posteriormente serem mantidas a 5 °C (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 – Relação dos microrganismos da cultura estoque coletados em distintas regiões do Brasil. CE: microrganismos coletados no Cerrado; FA: Floresta Amazônica; MA I: Mata Atlântica (vegetação próxima ao mar); MA II: Mata Atlântica (vegetação interiorana); PA: Pantanal; XA: microrganismos isolados de xarope; RQ: isolados de resíduo de queijo; SC: microrganismo sem codificação ou de origem desconhecida.

1	A+B 01	51	AAG 2	102	AAQ 12	152	AG 6	203	AS 6	253	T 16	303	AW 3	353	G 01
2	A+B 02	52	AAG 3	103	AAQ 14	153	AG 7	204	AS 6A	254	T 17	304	AW 4	354	G 02
3	A+B 03	53	AAG 5	104	AAQ 16	154	AH 1	205	AS 6A	255	T 18	305	AW 5	355	H 01
4	AA 02	54	AAG 6	105	AAQ 17	155	AH 6	206	AS 6B	256	T 2	306	AW 6	356	H 1
5	AA 03	55	AAG 7	106	AAQ 2	156	AI 03	207	AS 8	257	T 3	307	AW 7	357	I 01
6	AA 04	56	AAG 8	107	AAQ 3	157	AI 6	208	AS 9	258	T 5	308	AW 8	358	I 02
7	AA 05	57	AAG 8	108	AAO 5	158	AI 7	209	AT 02	259	T 6	309	AX 1	359	I 03
8	AAA 01	58	AAG 9	109	AAQ 5	159	AI 8	210	AT 03	260	T 8	310	AX 4	360	J 01
9	AAA 1	59	AAH 1	110	AAQ 6	160	AJ 02	211	AT 2	261	U 01	311	AX 6	361	J 06
10	AAA 10	60	AAH 3	111	AAQ 7	161	AJ 05	212	AT 7	262	U 03	312	AX 7	362	K 01
11	AAA 11	61	AAH 4	112	AAQ 8	162	AJ 10	213	AU 1	263	U 05	313	AX 8	363	K 1
12	AAA 2	62	AAH 5	113	AAQ 9	163	AJ 13	MA I		264	U 06	314	AX 9	364	L 01
13	AAA 4	63	AAI 1	114	AAR 1	164	AJ 14	214	AB 02	265	U 1	315	AY ?	365	L 02
14	AAA 6	64	AAI 2	115	AAR 2	165	AJ 3	215	AB 04	266	U 2	316	AY 10	366	L 03
15	AAA 7	65	AAI 3	116	AAR 5	166	AJ 6	216	AB 05	267	U 3	317	AY 11	367	L 04
16	AAA 9	66	AAI 4	117	AAS 1	167	AJ 7	217	AB 07	268	U 5	318	AY 12	368	M 01
17	AAB 1	67	AAI 5	118	AAS 10	168	AJ 8	218	AB 08	269	U 6	319	AY 13	369	M 01
18	AAB 1	68	AAI 6	119	AAS 12	169	AK 2	219	AB 09	270	V 01	320	AY 2	370	M 02
19	AAB 10	69	AAJ 1	120	AAS 3	170	AK 3	220	AB 1	271	V 02	321	AY 3	371	M 03
20	AAB 11	70	AAJ 2	121	AAS 4	171	AK 3	221	AB 10	272	V 03	322	AY 4	372	M 3
21	AAB 12	71	AAJ 4	122	AAS 5	172	AK 6	222	AB 11	273	V 04	323	AY 6	373	N 02
22	AAB 2	72	AAJ 5	123	AAS 8	173	AK 7	223	AB 12	274	V 07	324	AY 7	374	O 01
23	AAB 3	73	AAJ 6	124	AAT 1	174	AK 9	224	AB 13	275	V 10	325	AY 9	375	O 02
24	AAB 4	74	AAK 1	125	AAT 10	175	AL 1	225	AB 14	276	V 11	326	AY 9	376	O 03
25	AAB 5	75	AAK 10	126	AAT 12	176	AL 1B	226	AB 3	277	V 2	327	AZ 1	377	O 04
26	AAB 7	76	AAK 12	127	AAT 2	177	AL 2	227	AC 01	278	V 3	328	AZ 11	378	P 01
27	AAB 8	77	AAK 4	128	AAT 3	178	AL 3	228	AC 02	279	V 3	329	AZ 12	379	Q 01
28	AAC 1	78	AAK 5	129	AAT 4	179	AM 2	229	AC 03	280	X 01	330	AZ 13	380	Q 02
29	AAC 2	79	AAL 1	130	AAT 5	180	AM 3	230	AC 04	281	X 02	331	AZ 14	381	Q 03
30	AAC 3	80	AAL 2	131	AAT 7	181	AM 4	231	AC 06	282	X 04	332	AZ 15	382	S 01
31	AAC 6	81	AAL 4	FA		182	AN 2	232	AC 07	283	X 05	333	AZ 16	383	S 1
32	AAC 7	82	AAM 6	132	AE 06	183	AO 05	233	AC 08	284	X 06	334	AZ 17	XA	
33	AAC 8	83	AAN 1	133	AE 1	184	AO 4	234	AD 1	285	X 07	335	AZ 2	384	AAU 1
34	AAC 9	84	AAN 2	134	AE 4	185	AO 6	235	AD 10	286	X 08	336	AZ 3	RQ	
35	AAD 5	85	AAN 3	135	AE 06	186	AO 7	236	AD 11	287	Z 02	337	AZ 4	385	AAV 1
36	AAD 6	86	AAN 5	136	AE 8	187	AP 2	237	AD 14	288	Z 04	338	AZ 5	386	AAV 2
37	AAD 7	87	AAN 6	137	AF 05	188	AP 4	238	AD 9	289	Z 06	339	AZ 9	387	AAV 3
38	AAF 1	88	AAO 1	138	AF 08	189	AP 6	239	T 01	290	Z 07	PA		388	AAV 4
39	AAF 2	89	AAO 13	139	AF 1	190	AQ 1	240	T 02	291	Z 3	340	C 01	389	AAV 5
40	AAF 3	90	AAO 14	140	AF 10	191	AQ 3	241	T 03	292	Z 4	341	C 1	SC	
41	AAF 4	91	AAO 15	141	AF 11	192	AQ 5	242	T 04	293	Z 5	342	D 01	390	?
42	AAF 5	92	AAO 3	142	AF 13	193	AQ 6	243	T 05	294	Z 7	343	D 1		
43	AAF 6	93	AAO 5	143	AF 14	194	AR 3	244	T 07	MA II		344	E 01		
44	AAF 7	94	AAO 5	144	AF 2	195	AS 03	245	T 08	295	AV 2	345	E 02		
45	AAG 1	95	AAP 3	145	AF 4	196	AS 10	246	T 09	296	AV 3	346	E 03		
46	AAG 11	96	AAP 4	146	AF 6	197	AS 12	247	T 10	297	AV 4	347	E 1		
47	AAG 12	97	AAP 5	147	AF 7	198	AS 13	248	T 11	298	AV 5	348	E 2		
48	AAG 14	98	AAP 7	148	AG 1	199	AS 14	249	T 12	299	AV 6	349	F 01		
49	AAG 15	99	AAP 8	149	AG 2	200	AS 2	250	T 13	300	AV 7	350	F 03		
50	AAG 16	100	AAQ 1	150	AG 3	201	AS 4	251	T 14	301	AW 1	351	F 1		
		101	AAQ 10	151	AG 6	202	AS 5	252	T 15	302	AW 2	352	F 1		

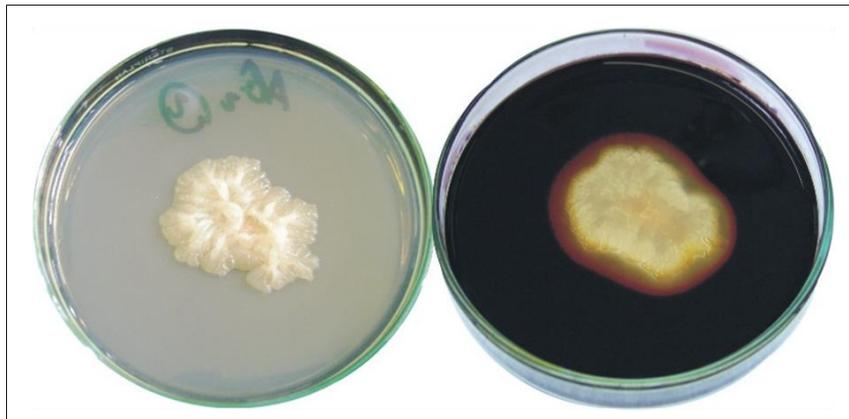
As leveduras selecionadas, LEB-T07 e LEB-AAQ5B, demonstraram potencial de produção de amilases e etanol, respectivamente, e foram os alvos de estudo neste trabalho. O sufixo B, acrescentado ao código original da cepa LEB-AAQ5, deveu-se à observação em bancada, para uma das cepas, que apresentou aspecto diferenciado de crescimento em placa de Petri em relação às demais de mesmo código, motivo pelo qual a destacamos.

Em adição ao material de estudo, foram recebidos dois exemplares isolados da levedura *Myriangium* sp. impregnados em papel. Os exemplares foram fornecidos pelo Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os dados obtidos com o trabalho sobre estes exemplares consideram ambos os exemplares como cepas distintas e serão demonstrados no Capítulo 4.

1.16.3. Seleção das leveduras produtoras de amilases

Cepas produtoras de amilases foram selecionadas devido à capacidade de degradação de amido solúvel como única fonte de carbono. O meio seletivo foi preparado em placas de Petri com seguinte composição: amido solúvel, 20 g/L; peptona, 10 g/L; extrato de levedura, 10 g/L e ágar, 20 g/L, que foram mantidas em câmaras de incubação sob temperatura de 30 °C por 48 h. Logo após, realizou-se revelação das placas com utilização de solução de lugol. Após 30 minutos, a solução de lugol foi descartada e as colônias de leveduras produtoras de amilases puderam ser observadas devido à formação de um halo descolorido ao redor da colônia, evidenciando ausência do amido solúvel original e, assim, a capacidade de produção de amilases (Figura 1.13).

Figura 1.13 – Resultado positivo do teste de atividade enzimática em meio sólido antes (à esquerda) e depois (à direita) da adição da solução de lugol.



Em primeira instância, foi realizada microscopia a fresco para esclarecer a pureza da cultura estudada. Experimentos deste autor revelam que cepas de leveduras associadas a bactérias podem produzir insumos devido exclusivamente à simbiose e, ainda, essa mesma cultura de levedura atuando isoladamente, não produz o insumo desejado. Neste caso, microscopia a fresco associada à coloração de Gram (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997) foi utilizada e apenas as culturas puras foram destinadas à continuidade dos estudos.

1.16.4. Verificação da produção de gás em meio líquido

A capacidade de produção de bioetanol pelas leveduras foi verificada após ativação do microrganismo na condição de inóculo em meio de cultura com a seguinte composição: glicose, 20 g/L; extrato de levedura, 10 g/L e peptona, 10 g/L. O pH foi ajustado para 5,5 com HCl.

Volume de 1 mL do inóculo foi transferido a tubos de ensaio contendo 14 mL de um meio de cultura em que tubos de Durham foram submersos com seguinte a composição: amido solúvel, 20 g/L; extrato de levedura, 1 g/L e peptona, 1 g/L. O pH foi ajustado para 5,5 com HCl.

Caso houvesse capacidade produtiva de etanol, o tubo de Durham submerso seria preenchido por CO₂ oriundo da descarboxilação do piruvato desde a hidrólise do amido com subsequente formação de glicose, passando pela glicólise até a formação do etanol.

As cepas testadas foram as mesmas que apresentaram capacidade produtiva em testes preliminares em meio sólido.

Para a continuidade da apresentação dos dados coletados em bancada, segue a redação de artigos científicos publicados ou encaminhados para publicação de modo a direcionar o leitor na ordem cronológica dos fatos científicos estudados e apresentar detalhadamente a estratégia de tratamento desses dados com ênfase na modelagem matemática para a determinação dos pontos ótimos, tanto para a produção de amilases quanto para a produção de etanol.

1.17. Referências Bibliográficas

AFDC. Alternative Fuels Data Center. Disponível em: http://www.afdc.energy.gov/fuels/ethanol_production.html. Acesso em novembro de 2021.

ANWAR, Z., GULFRAZ, M., AND M. IRSHAD..Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bioenergy: A brief review. **J Radiat Res Appl Biosci**, 7:163–173, 2014

ARAQUE E.; PARRA, C.; RODRIGUEZ, M.; FREER, J.; BAEZA, J. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p.120–123, 2008

ASGHER, M., AHMAD, Z., AND H.M.N. IQBAL..Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bioethanol production. **Ind Crop Prod**, 44:488–495. 2013

- AZEMA, J.; CHEBLI, C.; BON, M. New surfactants with sugar-based polar heads derived from bile-acids - the n-ursocholyd-d-glucosamine and n-dehydrocholyd-d-glucosamine. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, 14 (6): 805-817, 1995
- BAEK, S.-H., KIMA, S., LEEA, K., LEEB, J.-K., and J.-S. HAHNA. Cellulosic ethanol production by combination of cellulase-displaying yeast cells. **Enzyme Microb Technol**, 51:366–372. 2012
- BALLS, A. K.; SCHWIMMER, S. Digestion of raw starch. **J. Biol. Chem**, v. 156, p. 203-210, 1944.
- BASTIANONI, S.; MARCHETTINI, N. Ethanol production from biomass: analysis of process efficiency and sustainability. **Biomass and Bioenergy**, 11, 5: 411-418, 1996
- BHALLA, A., BANSAL, N., KUMAR, S.M., BISCHOFF, K.K., and R. SANI. Improved lignocellulose conversion to biofuel with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresour Technol**, 128:751–759, 2013
- BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S; SOUZA, V. B.; SILVA, J. B. A.; CARVALHO, G. B. M. Extending the kinetic solution of the classic Michaelis–Menten model of enzyme action. **J Math Chem**, v. 49, p. 1976–1995, 2011
- BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S. ; KOBLITZ, M. G. B. ; SILVA, C. G. S.; SOUZA, A., RABELO. Substrate and enzyme concentration dependence of the Henri Michaelis Menten model probed by numerical simulation. **Journal of Mathematical Chemistry**, v. 51, p. 144-152, 2013
- BÖRJESSON, J., PETERSON, R., and F. TJERNELD. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition. **Enzyme Microb Technol**, 40:754–762, 2007
- CAI, L. N., XU, S. N., LU, T., LIN, D. Q., & YAO, S. J. Halo-tolerant and thermostable mechanisms of an endoglucanase from marine *Aspergillus niger*. **Research Square**, 2021. doi.org/10.21203/rs.3.rs-1177446/v1

CANNELLA, D., HSIEH, C.-W., FELBY, C., and H. JORGENSEN. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnol Biofuels**, 5:26, 2012

CASTRO, M. M. S. Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica. Campinas-SP, Dissertação de Mestrado - UNICAMP, 124 p., 1995

CHANDRA, R.P., BURRA, R., MABEE, W.E., BERLIN, A., PAN, X., and J.N. SADDLER. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Biofuels**, 108:67–93, 2007

CHEN, W.; LIU, C. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.02, p.153-160, 1996

CHEN, X.A., ISHIDA, N., TODAKA, N. et al.. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* **Swo1. Appl Environ Microbiol**, 76:2556–2561, 2010

CHEN, F. AND R.A. DIXON. Downregulation of six lignin genes produces plants with improved saccharifiability, in some cases even without pretreatment (although pretreatment remains necessary to obtain the highest sugar yields). **Nat Biotechnol**, 25:759, 2007

COPELAND, R. A. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Wiley-VCH, Inc. ISBNs: 0-471-35929-7 (Hardback); 0-471-22063-9 (Electronic), 390p, 2000

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. Observatório Agrícola. Grãos: Acompanhamento da Safra Brasileira. V. 3 - SAFRA 2015/16- N. 4 - Quarto levantamento, janeiro 2016, ISSN: 2318-6852, 2016

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. Observatório Agrícola. Grãos: Acompanhamento da Safra Brasileira. Disponível em <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em novembro, 2021

- CRABTREE, H. G. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. **The Biochemical Journal**, v. 22, n. 5, p. 1289-98, 1928
- DODD, D. and I.K.O. CANN. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biol Bioenerg**, 1:2–17, 2009
- DORAN, P.M. Bioprocess engineering principles New York, London: **Academic Press.**, 439p, 1995
- DEMIRKAN, E. S., MIKAMI, B., ADACHI, M., HIGASA, T., UTSUMI, S. α -amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. **Process Biochemistry**, 40 2629-2636, 2005
- DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 63: 258-266, 2003
- EGGEMAN, T.; ELANDER, R. T. Process and economic analysis of pretreatment technologies, **Bioresource Technology**, 96 2019-2025, 2005
- ETHANOL BRASIL. Bioetanol - Etapa Decisiva. 14 de maio. Disponível em <http://ethanolbrasil.blogspot.com/>, 2007
- FAN, Z., WU, W., HILDEBRAND, A., KASUGA, T., ZHANG, R., and X. XIONG. A novel biochemical route for fuels and chemicals production from cellulosic biomass. **PLOS ONE** 7:e31693, 2012
- FAO. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Yearbook: World Food and Agriculture, 2021. <https://doi.org/10.4060/cb4477en>
- FISCHER, J., LOPES, V., SANTOS, E.F.Q., COUTINHO, F.U., and V. CARDOSO.. Second generation ethanol production using crude enzyme complex produced by fungi collected in Brazilian cerrado (brazilian savanna). **Chem Eng Trans**, 38:487–492, 2014
- GALBE, M. AND G. ZACCHI. A review of the production of ethanol from softwood. **Appl Microbiol Biochem**, 59:618–628, 2002
- GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends Biotechnol**, 29:419–425, 2011

HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Campinas, **Tese de Doutorado** – UNICAMP, 2006

HODAIFA, G., NIETO, L. M., KOWALSKA, M. Corn stover conversion into bioethanol and xylitol through an integral bioprocess: Kinetic study and modelling. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Volume 131, 2022. doi.org/10.1016/j.jtice.2022.104202

HORN, S.J., VAAJE-KOLSTAD, G., WESTERENG, B., and V.G.H. EIJSINK. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol Biofuels**, 5:45–57, 2012

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio ambiente, <http://www.ibama.gov.br/>, 2007

IEA – International Energy Agency. Oil 2021 – Analysis and forecast to 2026. **IEA Publications**, 163p, 2021.

IKRAM-UL-HAQ, HAMAD A., QADEER M. A., IQBAL, J. Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, 96 1201–1204, 2005

INOUE, H., KISHISHITA, S., KUMAGAI, A., KATOAKA, M., FUJII, T., and K. ISHIKAWA. Contribution of family 1 carbohydrate binding module in thermostable glycoside hydrolase to xylanase from *Talaromyces cellulolyticus* toward synergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol Biofuels**, 8:77, 2015

JAY, J. M. Microbiologia moderna de los alimentos. 3^a ed. **Editora Acribia**, 804 p., 1992

JAYANI, R.S., SAXENA, S., and R. GUPTA. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochem**, 40:2931–2944, 2005

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y.-S. Metabolic engineered for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Appl. Microbio. Biotechnol**, 63: 495-509, 2004

KARA, A.; OSMAN, B.; YAVUZ, H.; BEŞIRLI, N.; DENIZLI, A. Immobilization of α -amylase on Cu²⁺ chelated poly (ethylene glycol dimetadylate-n-vinyl imidazole) matrix via adsorption. **Reactive & Functional Polymers**, 62 61-68, 2005

KADAM, K. L. & McMILLAN, J. D. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. **Bioresource Technology**, 88, 17-25, 2003

KHAW, S. T.; KATAKURA, Y.; KOH, J.; KONDO, A.; UEDA, M.; SHIOYA, S. Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains form direct ethanol production from raw starch. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2005

KIM, S. & DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, 26 361-375, 2004

KONDO, A.; SHIGESHI, M.; ABE, M.; UYAMA, K.; MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; UEDA, M.; TANAKA, A.; KISHIMOTO, M.; FUKUDA, H. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 58:291-296, 2002

KUMLA, J., SUWANNARACH, N., SUJARIT, K., PENKHRUE, W., KAKUMYAN, P., JATUWONG, K., VADTHANARAT, S., LUMYONG, S. Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste – A Review. **Molecules**, 25, 2811; 2020, doi:10.3390/molecules25122811

KUMAR, S., GHALY, A.E., and M.S. BROOKS. Production of biodiesel from animal tallow via enzymatic transesterification using the enzyme catalyst NS88001 with methanol in a solvent-free system. **J Fundam Renew Energ Appl** 5:156. 2015

LIANG, C., XUE, Y., FIORONI, M. et al. Cloning and characterization of thermostable and halotolerant endoglucanase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4. **Appl Microbiol Biotechnol**, 89:315–326. 2011

LV, X., ZHENG, F., LI, C., ZHANG, W., CHEN, G., and W. LIU. Characterization of a copper responsive promoter and its mediated overexpression of the xylanase regulator 1 results in an induction-independent production of cellulases in *Trichoderma reesei*. **Biotechnol Biofuels** 8:67, 2015

- MAJOVIĆ, L.; NIKOLIĆ, S.; RAKIN, M. VUKASINOVIĆ, M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel**, 85 1750-1755, 2006
- MARTINEZ, A.T., SPERANZA, M., RUIZ-DUENAS, F.J. et al. Biodegradation of lignocellulosic: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int Microbiol**, 8:195–204. 2005
- MENDU, D. R., RATNAM, B. V. V., PURNIMA, A., AYYANNA, C. Affinity chromatography of a α -amylase from *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 37 712-717, 2005
- MICHAELIS, L, MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*. 49:333–369, 1913.
- MINISTERIO DA SAÚDE. Técnica de Coloração de Gram. Brasília:, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 63 p, 1997.
- MISUIKI, S., MUKAE, K., SAKAI, M., GOTO, M., HYASHIDA, S., FURUKAWA, K. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing α -amylases from *Bacillus* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, 37 410-416, 2005
- MOSER, F., IRWIN, D., CHEN, S.L., and D. B. WILSON. Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. **Biotechnol Bioeng**, 100:1066–1077. 2008
- NAKAZAWA, H., KAWAI, T., IDA, N. et al. Construction of a recombinant *Trichoderma reesei* strain expressing *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 for efficient biomass conversion. *Biotechnol Bioeng*, 109:92–99, 2012
- NWUFO, M. I.; FAJOLA, A. O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corn rots of *Colocasia esculenta*. **Acta Microbiologica Hungarica**, 35:371–378, 1988
- ODUM, H. T. Self-organization, transformity and information. **Science**, 242, 1132-1139, 1988

OKUDA, N.; NINOMIYA, K.; TAKAO, M.; KATAKURA, Y.; SHIOYA, S. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate or waste house using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 103, 4: 350-357, 2007

OLSSON, L. and B. HAHN-HAGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb Technol**, 18:312–331. 1996

PAULY, M. AND K. KEEGSTR. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **Plant J**, 54:559–568. 2008

PEIXOTO, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil. Campinas, SP (**Dissertação de Mestrado**), UNICAMP, 2006

QURESHI, N., EZEJI, T.C., EBENER, J., DIEN, B.S., COTTA, M.A., and H.P. BLASCHEK. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. **Bioresour Technol**, 99:5915–5922, 2008a

QURESHI, N., SAHA, B.C., and M.A. COTTA. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part II—Fed-batch fermentation. **Biomass Bioenerg**, 32:176–183, 2008b

RALPH, J., LUNDQUIST, K., BRUNOW, G. et al.. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochem Rev**, 3:29–60, 2004

REBIA – Rede Brasileira de Informação Ambiental. Disponível em <http://www.rebia.org.br/>. Acesso em fevereiro de 2020

REESE, E.T., SIU, R.G.H., and H.S. LEVINSON. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **J Bacteriol**, 59:485–497, 1950

RESHMI, R.; SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced activity and stability of α -amylase immobilizes on alumina. **Catalysis Communications**, 7 460-465, 2006

Rodrigues, R. C. L. B., Rodrigues, B. G., Canettieri, E. V., Martinez, E. A., Palladino, F., Wisniewski Jr, A. J., Durval Jr, R. Comprehensive approach of methods for microstructural analysis and analytical tools in lignocellulosic biomass assessment – A review, *Bioresource Technology*, 126627, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126627>

ROSENBERGER, A.; KAUL, H.-P.; SENN, T.; AUFHAMMER, W. Improving the energy balance of bioethanol production from winter cereals: the effect of crop production intensity. *Applied Energy*, 68 51-67, 2001

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: **Nottingham University Press**, 2003.

SAMUEL, D. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science*, v.273, n.5274, July 26, 1996, p.488-490. 1996

SCHOLEY, D.V.; BURTON, E. J.; WILLIAMS, P. E. V. The bio refinery; producing feed and fuel from grain. *Food Chemistry*. V. 197, p. 937–942, 2016

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial vol.II. Engenharia Bioquímica São Paulo:Ed. Edgard Blücher Ltda.*, 541 p., 2001

SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess engineering: Basic concepts*, 2nd ed., **Upper Saddle River: Prentice Hall PTR**, 553 p., 2002

SRIYAPAI, T., SOMYOONSAP, P., MATSUI, K., KAWAI, F., and K. CHANSIRI.. Cloning of thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng*, 111:528–536, 2011

SUKUMARAN, R.K., SINGHANIA, R.R., MATHEW, G.M., and A. PANDEY.. Cellulase production using biomass feed stock and its applications in lignocelluloses saccharification for bioethanol production. *Renew Energ*, 34:421–424, 2009

SUN, Y. and C. CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour Technol*, 83:1–11, 2002

SWISSINFO. Bioetanol chega na Suíça. Disponível em: <http://www.swissinfo.org/por/index.html>. Acesso em Agosto de 2020

TAHERZADEH, M.J. and K. KARIMI. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol production from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, 2:707–738, 2007

TANYILDIZI M. S., Özer D., ELIBOL, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**, 40 2291–2296, 2005

TEIXEIRA, L.C., LINDEN, C.J., AND H.A. SCHROEDER. Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. **Appl Biochem Biotechnol**, 84–86:111–127, 2000

TORNEY, F.; MOELLER, L.; SCARPA, A.; WANG, K. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. **Current Opinion in Biotechnology**, 18: 1-7, 2007

TSAI, S.L., GOYAL, G., and W. CHEN. Surface display of a functional minicellulosome by intracellular complementation using a synthetic yeast consortium and its application to cellulose hydrolysis and ethanol production. **Appl Environ Microbiol**, 76:7514–7520, 2010

TSAI, S.L., OH, J., SINGH, S., CHEN, R., and W. CHEN. Functional assembly of minicellulosomes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. **Appl Environ Microbiol**, 75:6087–6093, 2009

USDA. United States Department of Agriculture. Economic Research Service. The economics of food, farming, natural resources and rural America. Disponível em <http://www.ers.usda.gov/data/feedgrains/StandardReports/YBtable1.htm> Acesso em agosto de 2020.

UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar. <http://www.unicadata.com.br/>. Acesso em setembro de 2021

- UGURU, G. C.; AKINYANJU, J. A.; SANI, A. The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. **Enzyme and Microbial Technology**, 21: 48-51, 1997
- VANDAN, W.A., SABAT, G., MOZUCH, M., KERSTEN, P.J., CULLEN, D., and R.A. BLANCHETTE. Structure, organization and transcriptional regulation of a family of copper radical oxidase genes in the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**, 72:4871–4877, 2006
- VARGA, E., KLINKE, H.B., RECZEY, K., and A.B. THOMSEN. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnol Bioeng** 88:567–574. 2004
- WANDERLEY, K. J.; TORRES, F.A.G.; MORAES, L.M. P., ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Fems. Microbiology Letters*, v.231, p.165-169, 2004
- WANG, J., BAI, Y.P., LUO, H. et al. A new xylanase from thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range. **World J Microbiol Biotechnol**, 26:917–924. 2010
- WEN, Z., LIAO, W., and S. CHEN. Production of cellulose/beta-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochem**, 40:3087–3094, 2005
- WEN, F., SUN, J., and H. ZHAO. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. **Appl Environ Microbiol**, 76:1251–1260, 2010
- WILSON, B.D. Cellulases and biofuels. **Curr Opin Biotechnol**, 20:295–299, 2009
- WU, A. and Y.Y. LEE. Nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Appl Biochem Biotechnol**, 70–72:479–492, 1998

WU, S., LIU, B., and X. ZHANG. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. **Appl Microbiol Biotechnol**, 72:1210–1216, 2006

XIAO, C. and C.T. ANDERSON. Roles of pectin in biomass yield and processing for biofuels. **Plant Sci**, 4:67, 2013

YADAV, V., GUPTA, N., KUMAR, P., DASHTI, M. G., TIRTH, V., KHAN, S. H., YADAV, K. K., ISLAM, S., CHOUDHARY, N., ALGAHTANI, A., BERA, S. P., KIM, D.-H., JEON, B.-H. Recent Advances in Synthesis and Degradation of Lignin and Lignin Nanoparticles and Their Emerging Applications in Nanotechnology – A Review. **Materials**, 15, 953, 2022. <https://doi.org/10.3390/ma15030953>

YANG, D., WENG, H., WANG, M., XU, W., LI, Y., and H. YANG. Cloning and expression of a novel thermostable cellulose from newly isolated *Bacillus subtilis* strain 115. **Mol Biol Rep**, 37:1923–1929, 2010

YAO, G., LI, Z., GAO, L. et al. Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnol Biofuels** 8:71, 2015

ZHENG, L., XU, Y., LI, Q. et al. Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. *Bioresour. Bioprocess.* 8, 79 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00432-z>

ZHI, W., SONG, J., OUYANG, F. BI, J. Application of response surface methodology to the modeling of α -amylase purification by aqueous two-phases systems. **Journal of Biotechnology**, 118 157-165, 2005

Capítulo 2 - Amylase Production Using Brazilian Wild Yeast and Simple Fermentation

Submetido à Journal of Food Science

AMYLASE PRODUCTION USING BRAZILIAN WILD YEAST AND SIMPLE FERMENTATION

ABRAÃO BRITO PEIXOTO, BRUNA CONDÉ, JOSÉ AÍLTON CONCEIÇÃO BISPO, ROSANA GOLDBECK, CARLOS FRANCISCO SAMPAIO BONAFÉ, ERNESTO ACOSTA MARTÍNEZ

2.1 Abstract

The amylases are enzymes that promote hydrolysis reactions of starches. They can be obtained from plant, animal, or microbial sources. The products resulting from the hydrolysis of the starch molecules are dependent on each type of active amylase. The food, chemical, and pharmaceutical industries are the ones that demand these enzymes in more significant proportions. The objective of this work was to study the optimal conditions for the production of amylases originating from the yeast LEB-T07, previously isolated, by using the mathematical modeling based on the Boltzmann Transfer Equation, where the rate of enzymatic activity was obtained after derivation of the adjustment equation. Different conditions of hydrolysis temperature (40, 50, and 60 °C) and fermentation time (up to 210 h) applied in three separate batches (batch 1: 0.0 vvm; batch 2: 0.1 vvm; batch 3: 1.0 vvm). All batches were 150 rpm, temperature of 30 °C and pH 5.5. Experimental data showed significant differences in amylase production with 95 % confidence. Batch 1 showed highest enzymatic activity of 4.2 U/ mL when the fermentation lasted 150 h or over 200 h. The highest enzymatic activity was observed for batch 2 (9.19 U/mL), under fermentation time of approximately 120 h combined with hydrolysis process in reactors submitted to temperatures above 60 °C. In batch 3, it was observed a reduced ability of amylases synthesis. The highest amylase productivity (0,29 U/mL.h) was observed for batch 2 after 200 h of fermentation for hydrolysis processed at temperatures around 40 °C. Then, batch 2 was the best condition to provide synthesis of amylase because it produces enzymes with higher activity (9.19 U/mL). This condition denotes lower energy expenditure because it requires a shorter hydrolysis time for the same starch concentration.

2.2 Resumo

As amilases são enzimas que promovem reações de hidrólise de amidos. Eles podem ser obtidos de fontes vegetais, animais ou microbianas. Os produtos resultantes da hidrólise das moléculas de amido são dependentes de cada tipo de amilase ativa. As indústrias

alimentícia, química e farmacêutica são as que demandam essas enzimas em proporções maiores. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições ótimas para a produção de amilases originárias da levedura LEB-T07, previamente isolada, utilizando a modelagem matemática baseada na Equação de Transferência de Boltzmann, onde a taxa de atividade enzimática foi obtida após derivação de a equação de ajuste. Diferentes condições de temperatura de hidrólise (40, 50 e 60 °C) e tempo de fermentação (até 210 h) aplicadas em três bateladas separadas (batelada 1: 0,0 vvm; batelada 2: 0,1 vvm; batelada 3: 1,0 vvm). Todas as bateladas foram 150 rpm, temperatura de 30°C e pH 5,5. Os dados experimentais mostraram diferenças significativas na produção de amilase com 95% de confiança. A batelada 1 apresentou maior atividade enzimática de 4,2 U/mL quando a fermentação durou 150 h ou mais de 200 h. A maior atividade enzimática foi observada para a batelada 2 (9,19 U/mL), sob tempo de fermentação de aproximadamente 120 h combinado com processo de hidrólise em reatores submetidos a temperaturas acima de 60 °C. Na batelada 3, observou-se a redução da capacidade de síntese de amilases. A maior produtividade de amilase (0,29 U/mL.h) foi observada para a batelada 2 após 200 h de fermentação para hidrólise processada em temperaturas em torno de 40°C. Então, a batelada 2 foi a melhor condição para fornecer síntese de amilase, pois produz enzimas com maior atividade (9,19 U/mL). Esta condição de amido denota menor gasto energético, pois requer um menor tempo de hidrólise para a mesma concentração.

2.3 Introduction

According to the Freedonia Group Incorporated (Global Industrial Enzymes Market), the businesses market associated with the commercialization of amylases correspond to approximately 25 % of the total enzyme market. The food, chemical, and pharmaceutical industries are the ones that demand these enzymes in more significant proportions.

Amylases are enzymes that hydrolyze starch molecules resulting in different sizes of polymers of glucose, which are progressively broken into smaller ones, ultimately resulting in glucose units. Amylase enzymes are categorized according to their situs of action: α -amylase (cleaves the α ,1-4 glycosidic linkage), β -amylase (hydrolyzes alternate α ,1-4 glycosidic linkage from the non -6 linkage), and glucoamylase, also known as γ -amylase (cleaves α ,1-4 -6 linkage releasing single glucose units from the non-reducing and -6 glucosidic linkage of starch) (Kumari et al., 2019).

They are derived from plants, animals, or microbial sources. Nevertheless, amylases from microorganisms provide several advantages when compared to the other sources, including cheaper production and an easier way to manipulate and control the production process making it possible to obtain enzymes with tailored characteristics (Kumari et al., 2019).

The enzymes originating from microorganisms correspond to the largest share of the enzymes market (Markets, 2020). The enzymes market is valued at US\$ 10 bi, and it is estimated to increase to almost US\$ 15 bi by 2025 (Markets, 2020). Thus, it is an exciting niche for industry and research centers to focus on improving processes aimed at increasing productivity, even under conditions of industrial facilities available for the production of fuel ethanol. This would be even more relevant if conditions for using abundant and cheap carbohydrates were adopted.

The microorganisms producing amylases are bacteria, fungi, and yeast. Studies carried out with fungi by (Hernández et al., 2006), (Avwioroko et al., 2016), and (Palukurty & Somalanka, 2016) showed the great ability of these microorganisms to hydrolyze this starch molecule. Similarly, there are few other studies on the production of yeast amylases (Adam et al., 2004; Kondo et al., 2002; Laitila et al., 2006) since yeasts are microorganisms showing good growth and storage potential. Their ability to produce enzymes in low concentrations or characteristics that are not ideal for industrial interests makes them an attractive source for enzymatic production.

The product of total starch degradation is, for example, α -D-glucose-1P by the enzyme starch phosphorylase (EC: 2.4.1.1), whose partial hydrolysis action can generate a more complex molecule such as amylose. The enzyme glucoamylase (EC: 3.2.1.3), responsible for the total hydrolysis of starch to α -D-glucose, has better known and required actions. Maltose and maltodextrins can also be obtained by the action of β -amylases (EC: 3.2.1.2) on starch glycosidic bonds. Industrially, the action of amylase on the starch molecule must be stable within the optimal range of enzyme action (KEGG, 2021).

Optimal process conditions, particularly temperature and time, were studied to uncover the maximum enzymatic activity from the optimization concept presented by Bispo and colleagues (Bispo et al., 2015; Bispo et al., 2014; Bispo et al., 2013), associated with the Boltzmann Transport Equation for the definition of the fit equation, whose methodology was consolidated in work developed by Amorin et al. (2018). The objective of this work was to

investigate the performance of amylases in function of the temperature. Amylases were produced by wild yeast strain under different aeration conditions during fermentation.

2.4 Materials and Methods

The methodology was based on initially fermenting three different batches at the same temperature, which were further submitted to different conditions to assess the effect of hydrolysis temperature, fermentative aeration, and time on enzymatic activity.

2.4.1 Acquisition of yeast strains

The yeast strain LEB-T07 was obtained from the Bioprocess and Metabolic Engineering Laboratory (LEMeB) at the University of Campinas (Unicamp, Campinas, SP, Brazil). This yeast strain was selected from a pool of 390 wild yeast strains harvested from different locations in Brazil (Hernalsteens, 2006). The choice of yeast was based on the ability of the yeast to produce amylase, as previously presented by (Peixoto et al., 2013).

2.4.2 Reaction medium for fermentation

The medium used for the fermentation process was made as follows: 75.0 g/L of soluble starch was added to a solution of KH_2PO_4 (5.0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.8 g/L), and yeast extract (1.0 g/L). The pH was adjusted to 5.5 with 0.5 N HCl. This medium was used for all studied processes.

2.4.3 Fermentation Equipment

Bioflo III automated bioreactor (New Brunswick, Eppendorf, United States) and fermentation vessels with a suitable volume of 1.0 L. The stirrers used were of the Rushton turbine type, at the base of the stirring axis, and naval propeller, superior to that one. Mettler Toledo pH (brand, city, state, country) and pO_2 probes. Microbiological filters for compressed air with 0.22 μm pores (Micropore, San Diego, California, United States). This aeration range was used to denote a process without aeration (0.0 vvm), with micro aeration (0.1 vvm) and abundant aeration (1.0 vvm) so that the conditions studied exhibited a discrepancy in behavior due to the concentration of dissolved oxygen in the medium.

Fermentative Processes

Initially, the fermentation process was carried out at 30 °C, for all of the batches. Then, the batches were assessed by submitting centrifuged aliquots from each of them, under different conditions (temperatures of 40, 50 e 60 °C), and further spectrophotometrical analysis. Each

batch was prepared as described: Batch 1 (without aeration), Batch 2 (0.1 vvm aeration); Batch 3 (1.0 vvm aeration): The pH (5.5) was controlled with 2.0 M NaOH using the Bioflo III bioreactor automation standard by means of a peristaltic pump associated with the equipment platform (New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, Germany). Aeration was maintained with manual adjustment in rotameter external to the bioreactor. Stirring was maintained at 150 rpm throughout the process.

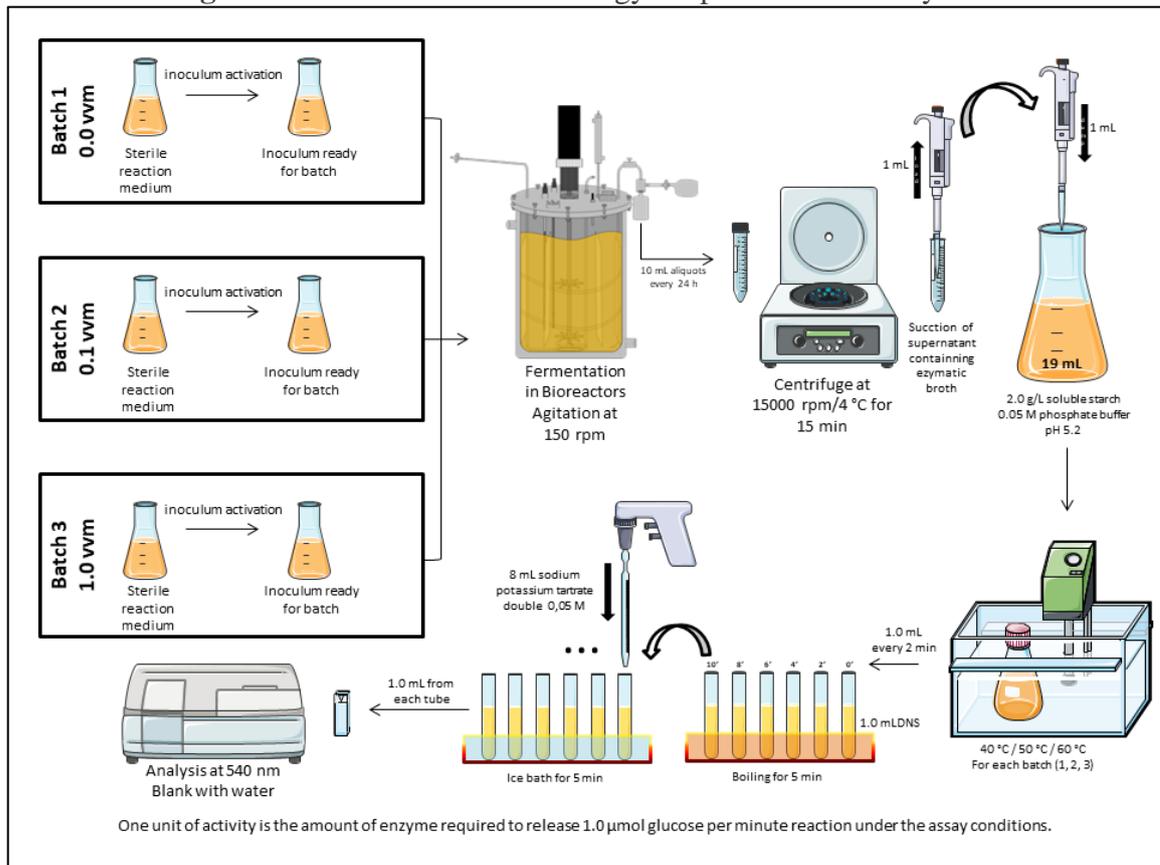
2.4.4 Sampling

During the fermentation process, aliquots of 10 mL were taken every 24 h. The fermented medium was centrifuged at 15000 rpm at 4°C for 20 min (Sorvall RC 26 Plus Du Pont, Wilmington, Delaware, United States). The supernatant was reserved and filtered through 0.22 µm pores (Micropore, San Diego, California, United States) for analysis of amylase activity present in the medium.

2.4.5 Enzymatic Activity

To assess the enzymatic activity, 19 mL volume of soluble starch solution (2 g/L) was added to 0.05 M phosphate buffer, and a pH of 5.2 was kept in vials under shaking in a thermostatic bath at 40°C, 50°C or 60°C (as suggested by Araque et al. (2008) and Demirkan et al. (2005)). Then, 1 mL aliquots of the centrifuged enzyme-containing solution were added to the flask. 1 mL aliquots were collected for 10 minutes every 2 minutes of enzyme activity and added to test tubes containing 1 mL DNS (3,5-dinitrosalicylic acid). An aliquot of 1.0 mL of the sample was also collected at zero reaction time to adjust the concentration of reducing sugars formed from the hydrolysis of the starch molecule glycosidic bonds. The methodology here applied followed the study carried out by Miller (1959) with modifications for the amount of tartrate added (8 mL in this experiment). Absorbances were measured at 540 nm in a spectrophotometer (Varian, Palo Alto, California, United States), and the results were calculated as the average of triplicates corrected by water blank. It was defined that one unit of activity as the amount of enzyme required to release 1.0 µmol glucose per minute reaction under the assay conditions. The Figure 2.1 demonstrates a global understanding of the experimental sequence.

Figure 2.1- Illustrative methodology for production of amylases



2.4.6 Mathematical Modeling Conditions

Following the methodology stated in Bispo et al. (2013), with considerations shown in Bispo et al. (2014 and 2015), and Amorim et al. (2018), ten experimental points were treated to obtain the equation to describe the behavior observed through the data collected in each process condition (Batches 1, 2 and 3). The calculated Enzyme Activity (EA) was related to the temperature and fermentation time, and the relationship with the temperatures tested for the aliquots containing amylase. Successive approximations were adopted based on the Boltzmann Equation of Transport (Eq. 2.1), whose first solutions were found by Gressman and Strain (2010).

In the present investigation, the experimental data were proposed to be fitted using the following Boltzmann fitting function (B):

$$B = \sum_{i=1}^{n-1} f_i (y_{i+1} - y_i) + y_n \quad (\text{Eq. 2.1})$$

where y i -th is the experimental data, n is the total number of experimental points and f_i corresponds to the relative species fraction, given by

$$f_i = \frac{1}{1 + \exp((x_T - x_m(i))/\tau)} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

Here, x_T is the theoretical independent variable of the y property, τ is the transition coefficient, $x_m(i)$ is the medium point defined as:

For $i=1$ up to $n-1$

$$x_m(i) = X(i) + (X(i+1) - X(i))/2 \quad (\text{Eq. 2.3})$$

so that X is the experimental independent variable

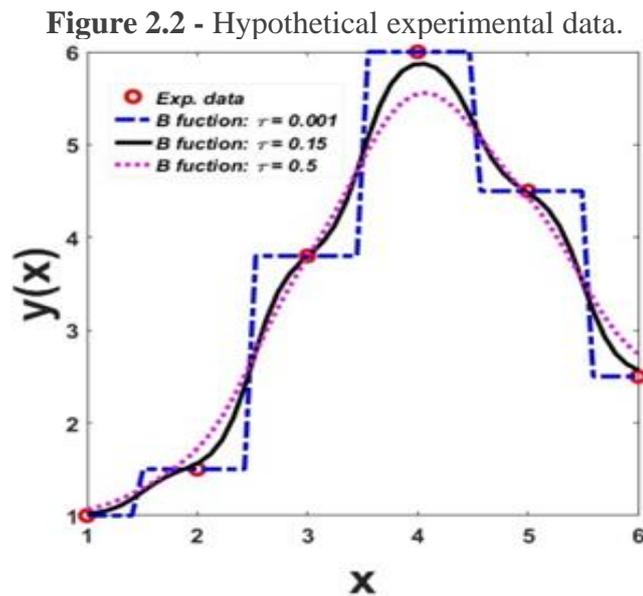
To demonstrate the applicability of the B function, consider a hypothetical experimental data where $y=[1; 1.5; 3.8; 6; 4.5; 2.5]$ and $X=[1; 2; 3; 4; 5; 6]$, as showed in Figure 2.2. In this case, $n=6$, $x_m = [1.5; 2.5; 3.5; 4.5; 5.5]$. If we want that the B function has 50 points, for instance, we can use the following code to obtain x_T :

$$\begin{aligned} x_i &= X(1) = 1 \\ x_f &= X(6) = 6 \end{aligned}$$

For $j=1$ up to 50

$$x_T(j) = x_i + (x_f - x_i) * (j - 1)/(50 - 1)$$

Since we have, n , x_T and x_m , the only unknown parameter of the B function is the transition coefficient (τ). Thus, in Figure 2.2 we can observe the results obtained for this function using the previous data at distinct τ values.



As can be observed in Figure 2.2 reduced τ values ($\tau = 0.001$) leads the B function to describe a step function passing through the experimental data with inflexion point at the $x_m(i)$ values. As τ increases a more softly theoretical expression of the experimental data can be obtained ($\tau = 0.15$ and 0.5) and at high values this function tends to express the average value of the y data. In this view, ones can use this procedure to obtain approximated differentiable curves to characterize any experimental data just defining the value of the transition coefficient (τ).

2.5 Results and Discussion

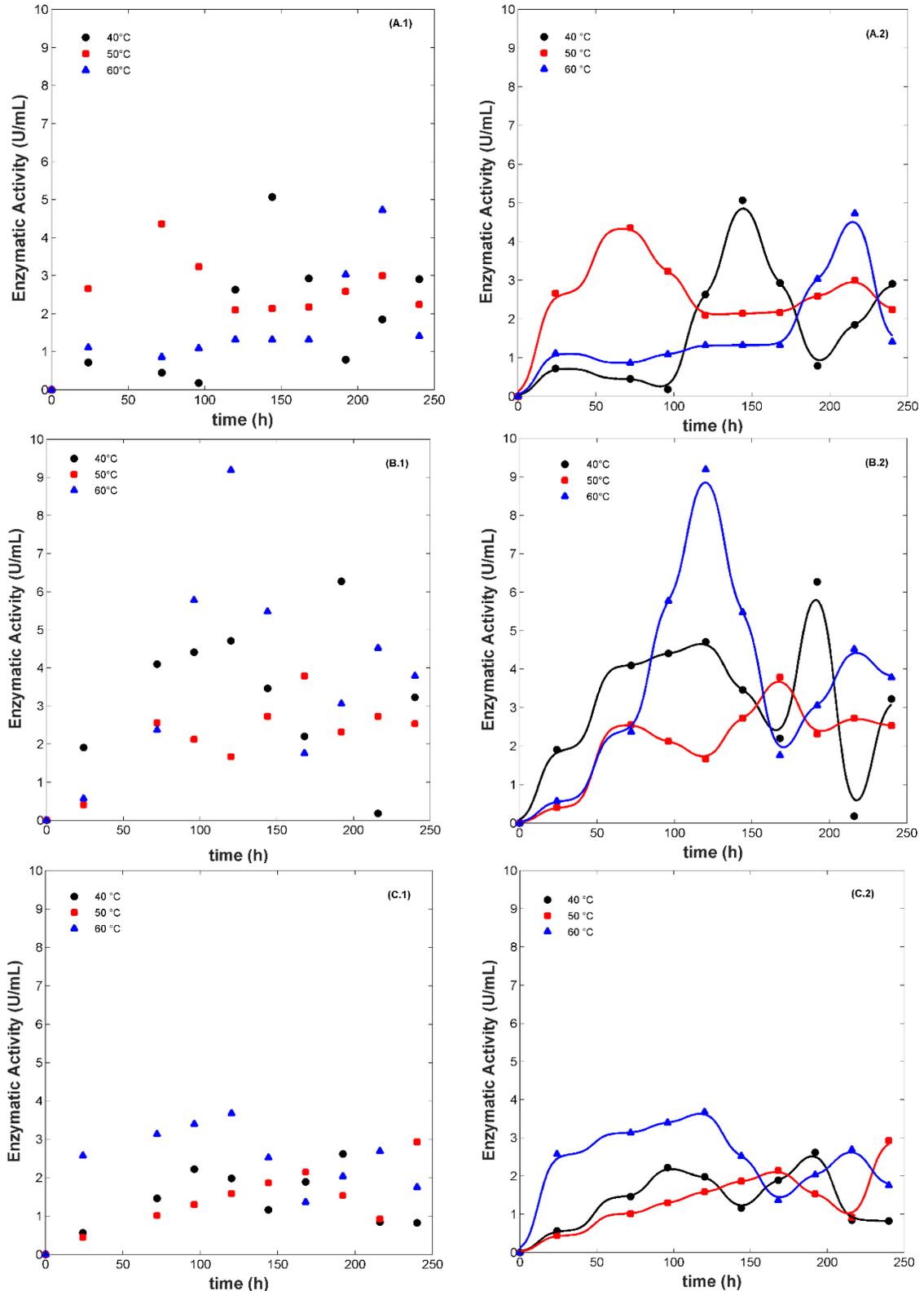
The results showed divergences in regard to the considerations of each parameter studied. The different conditions resulted in regions that showed higher or lower enzymatic activity. The Enzymatic Activity (EA) for each treatment evaluated is shown in Table 2.1 and from Figure 2.3 to Figure 2.5.

Table 2.1- Experimental data of enzymatic activity extracted from the proposed assays.

t (h)	Batch 1 (0.0 vvm)			Batch 2 (0.1 vvm)			Batch 3 (1.0 vvm)		
	Enzymatic activity (U/mL)								
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.72	2.66	1.11	1.91	0.40	0.57	0.56	0.44	2.57
72	0.45	4.36	0.86	4.10	2.56	2.37	1.46	1.01	3.13
96	0.18	3.23	1.09	4.41	2.12	5.78	2.22	1.30	3.40
120	2.63	2.10	1.32	4.71	1.67	9.19	1.98	1.58	3.68
144	5.07	2.14	1.32	3.46	2.73	5.48	1.16	1.86	2.52
168	2.93	2.17	1.32	2.20	3.79	1.76	1.89	2.14	1.36
192	0.79	2.59	3.03	6.27	2.32	3.06	2.62	1.53	2.03
216	1.85	3.00	4.73	0.18	2.73	4.52	0.82	0.92	2.69
240	2.91	2.24	1.41	3.23	2.53	3.79	0.82	2.93	1.75

From the enzymatic broth extracted from Batch 1 (without aeration) (Figure 2.3A.1, A.2), it was observed that an increase in temperature from 40 to 50 °C caused an increase in EA for the enzymes from the enzymatic broth collected in the first 96 h of the fermentation process, time from which the enzymes submitted to a temperature of 40 °C showed a significant increase in EA, reaching an activity of 5.07 U/mL in the time of 144 h. Under the condition of 60 °C, the enzymes presented significantly higher activity values than those under 50 °C only after 168 h of fermentation, but still lower than the maximum value (5.07 U/mL) observed for all the different conditions studied (Figure 2.3 A.1, A.2).

Figure 2.3 - Experimental data from Enzyme Activity for the samples performed in 3 batches; A.1, Batch 1; B.1, Batch 2; C.1, Batch 3; and their respective approximations using the mathematical model adopted for process optimization; A.2, Batch 1; B.2, Batch 2; and C.2, Batch 3.



The highest value for the EA obtained from the enzymatic broth extracted from Batch 2 (Figure 2.3 B.1, B.2) was 9.19 U/mL, under hydrolysis at 60 °C. It was observed that the

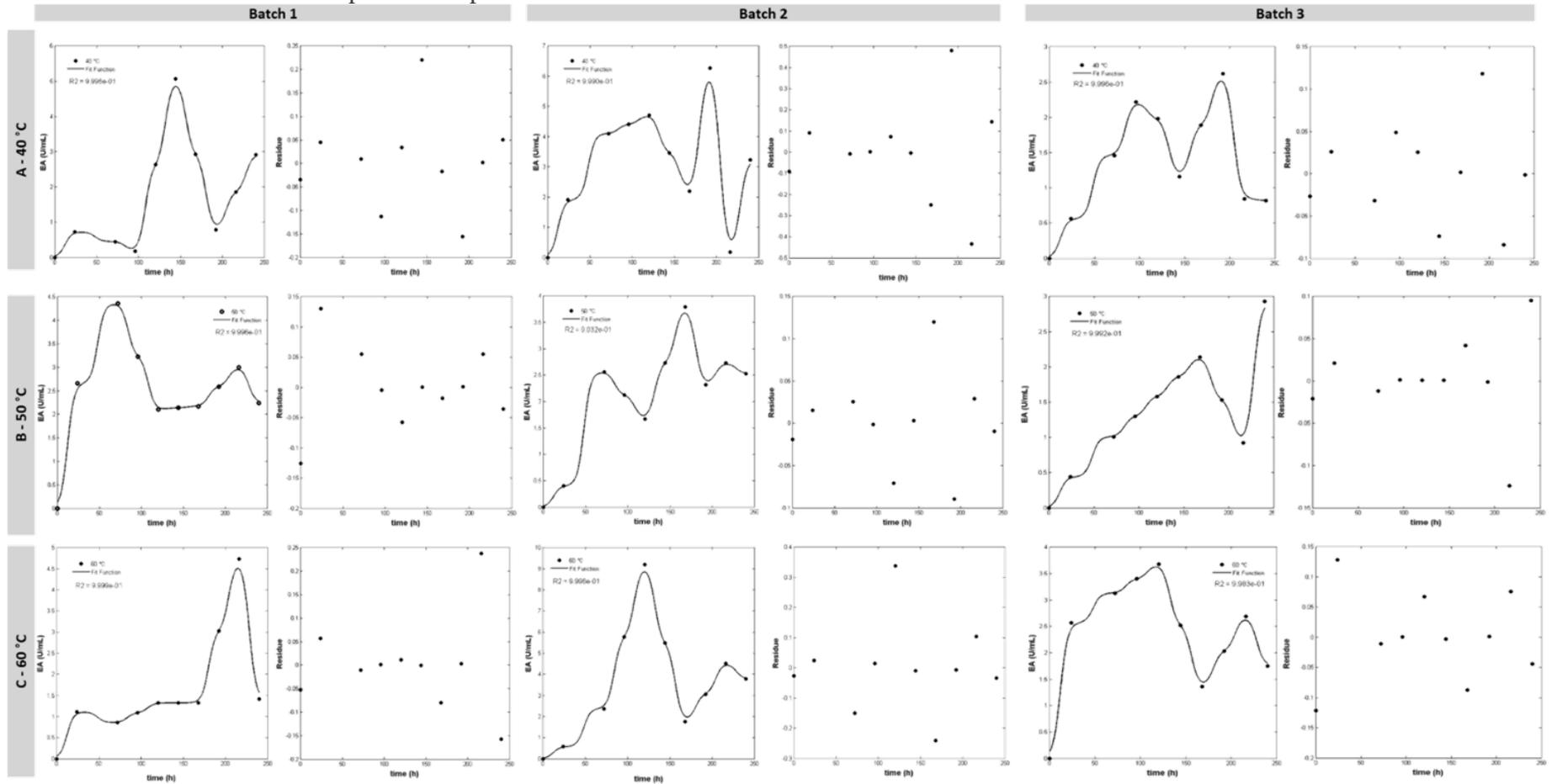
enzymatic broth collected at the beginning of fermentation (up to 70 h approximately) had higher EA at 40 °C. However, after this initial time, the enzymatic activity had its peak under hydrolysis at 60 °C, and the graph suggested that it is not advantageous to continue the fermentation after 120 h. There was a sharp drop in EA at both 40 and 60 °C, after the 120h mark, while the increase in activity observed at 50 °C might not be economically viable (maximum of 3.79 U/mL after 168 h).

The activity of enzymes produced up to approximately 100 h from the enzymatic broth extracted from Batch 3 (1.0 vvm aeration) (Figure 2.3 C.1, C.2) showed more thermophilic characteristics compared to those produced under the other conditions. However, even when submitted to a fermentation time of 120 h /hydrolysis at 60 °C, the highest calculated EA was 3.68 U/mL. During almost the entire hydrolysis interval studied, the enzymes submitted to a temperature of 40 °C showed higher starch degradation capacity than those submitted to a temperature of 50 °C, but it was still lower than those at 60 °C.

The Figure 2.4 shows the relationship between experimental data and the approximation achieved with the methodology adopted with mathematical modelling. The results give direction to further studies and illustrate the curves of mathematical modeling with the respective residues observed for the EA's under the conditions of 40, 50, and 60 °C.

It is worth noting the coefficients of determination (R^2) calculated for each condition studied. The R^2 for each plot showed the direct statistical response between the mathematical model adopted and the experimental data obtained, as highlighted by Rodrigues and Iemma (2014). This scenario can also be interpreted by plotting the residuals, whose points are little dispersed, and highlighting considerable statistical approximation for the interpretation of the phenomena involved in the hydrolysis process studied here.

Figure 2.4 - Adjustments of the experimental points through the mathematical model adopted for the optimization for each batch, according to different temperatures 40, 50 and 60 °C (A, B and C). The values for the determination coefficients (R2) are displayed as well as the residuals for each experimental point studied



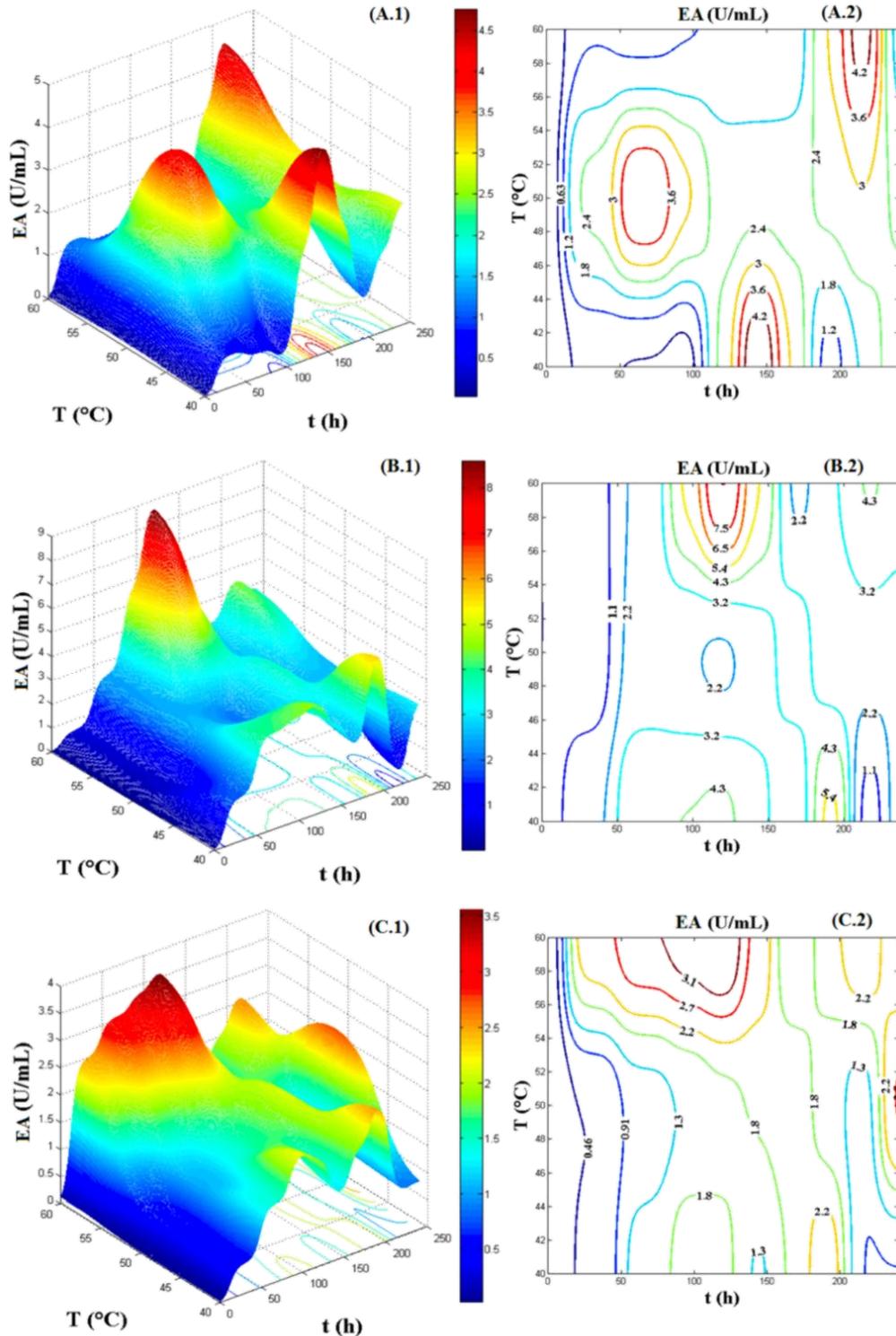
Then, in order to obtain the response surface based on experimental data, a simultaneous correlation between the parameters of fermentation time, hydrolysis temperature of the sampled enzyme and the response (EA) was performed. This procedure followed a simulation based on the adopted mathematical model, inspired by the Boltzmann Transport Equation (Gressman & Strain, 2010), even for those experimental conditions not contemplated experimentally but within the studied parametric range.

The analysis of the response surfaces showed regions of maximum enzymatic activity in relation to the time and temperature parameters (Figure 2.5 A.2, B.2, C.2).

This feature highlights the robustness of the adjustment methodology, as it allows the reader to evaluate the conditions in which, by choosing the condition of lower energy expenditure, the response in the region considered optimal is maintained. In order to identify the best process conditions for the highest possible EA, one might define that the optimal process condition is when the time is the shortest, the hydrolysis temperature is the lowest, and the value of EA is the highest. And so, we shall analyze the optimal process conditions for all of the three batches:

i) The most appropriate conditions for amylase production, for batch 1 (Figure 2.5 A.2), would be a fermentation time of approximately 60 h, whose enzymes collected under these conditions would have an EA of approximately 3.6 U/mL, at a temperature of hydrolysis of approximately 48 °C. On the other hand, the highest EA value observed in Figure 2.5 A.2 was 4.2 U/mL for amylases collected at either fermentation time of approximately 150 h and temperature of starch degradation between 40 and 42 °C, or a time above 200 h, and hydrolysis at temperatures above 58 °C. These later process conditions, however, should not be considered ideal, even if there is a 17% increase in EA, but with a time-lapse of at least 100 h of fermentation, during which time the process would be subject to energy and energy expenditure, as well as higher nutrients for maintenance. And so, it is required to consider whether obtaining the highest value of EA is worth it economically.

Figure 2.5 - Response surface and contour curve for amylase activity by LEB-T07 strain under experimental conditions for each batch. A.1, response surface for Batch 1; B.1, response surface for Batch 2; C.1, response surface for Batch 3; A.2, contour curve for Batch 1; B.2, contour curve for Batch 2; C.2, contour curve for Batch.



ii) The optimal process condition in batch 2 (Figure 2.5 B.2) is at fermentation time around 120 h, when enzymes showed an EA of 7.5 U/mL for hydrolysis processed at

approximately 58 °C. This condition seems more attractive than in batch 1 since the EA approximately doubled its value. Nevertheless, this increase in EA observed is accompanied by a longer fermentation time. Thus, the cost for each batch should be considered when selecting the best process conditions.

iii) The most indicated process for batch 3 (Figure 2.5 C.2) was found for a value of 3.1 U/mL EA, fermentation time of approximately 90 h, and temperature above 56 °C. When considering this scenario, it is worth noting that batch 3 was an aerobic process known to be more favorable to microbial growth. When considering the higher number of active microbial cells in batch 3 (when compared to batches 1 and 2) and the low oxygen tension, then a smaller EA is assumed since larger cells concomitantly perform the production of amylases (and so, with lower EA). This effect suggested the existence of intercellular chemical transmitters capable of establishing a communication network between cells, such as a social model with antagonistic or synergetic relations in order to provide glucose to those cells, since glucose is a product of starch hydrolysis. Nevertheless, these communication mechanisms are better explained by Alberts et al., (2002), Woo et al., (2009), Ryan & Dow, (2011) and Yajima, (2014). In summary, when selecting the best process conditions, economic factors might also be considered together with the requirements for EA values.

Nevertheless, additional information obtained by evaluation of the response surfaces illustrated in Figure 2.6 might assist in decision-making when selecting the optimum process conditions. As stated beforehand, the plots were obtained by deriving the adjustment equations from the fermentation time to determine the critical point (Figure 2.6).

The critical points observed in the surfaces obtained from the derivation of the adjustment equation provide us with a better understanding of the process. Assuming only the calculation pathways (letting aside the phenomenological involvement related to energy and handling costs), one can interpret the process conditions from the principle of formation of glucose molecules per minute of reaction, interpretation of the unit of enzymatic activity (U) for each sample of the amylase complex evaluated in the three consecutive batches. The maximum observed points on the surfaces, let us call it regions of interest (ROI), are obtained when the rate of amylase formation is maximum, which is the ideal section for maintaining the process parameters with the intention of prolonging the maximum enzyme production conditions. At the ROI condition, fermentative processes could be maintained through fed

batches to ensure permanent conditions of steady-state enzyme production. The mathematical analysis illustrated in Figure 2.6 showed:

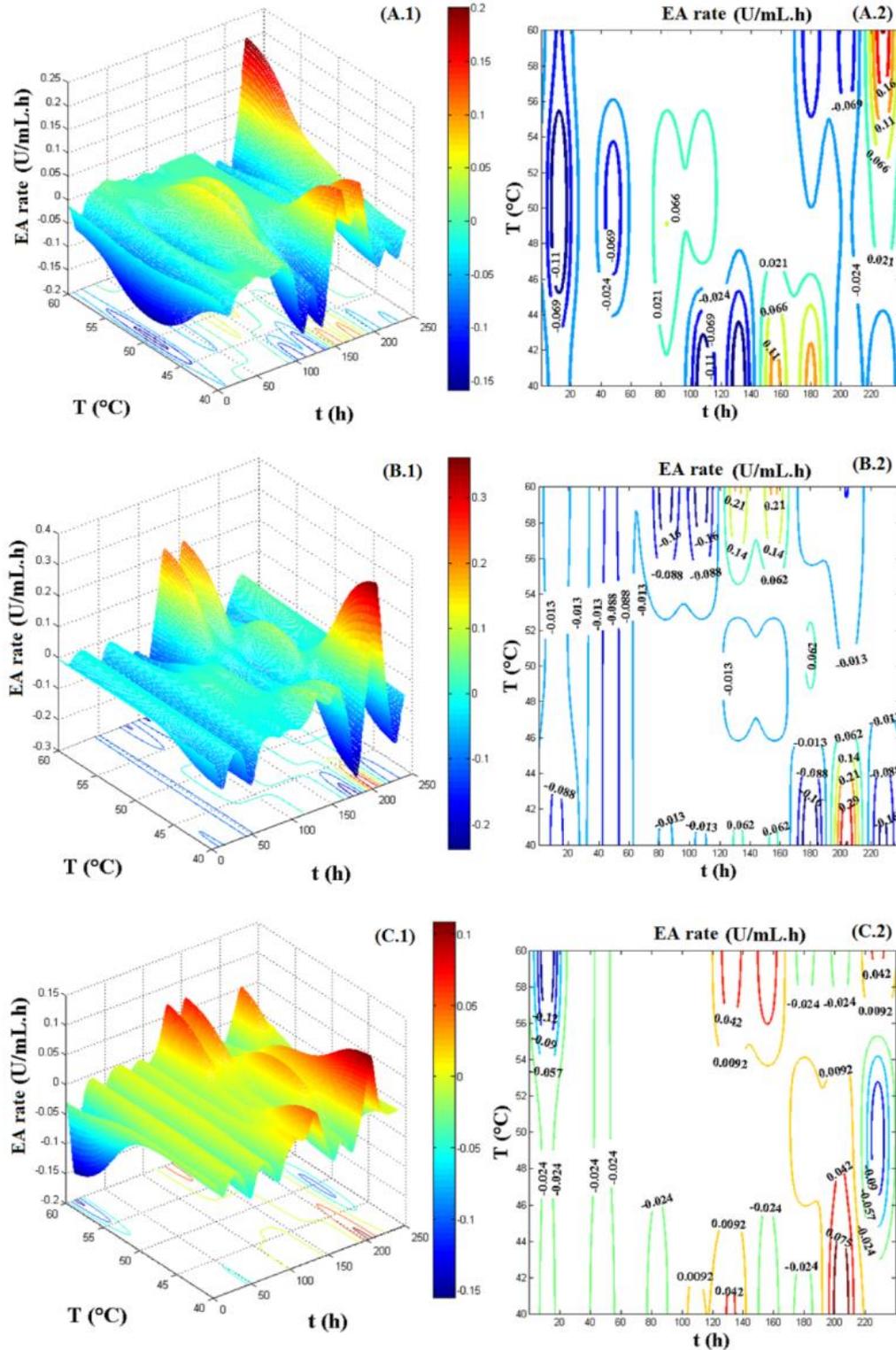
i) The maximum hydrolysis rate was 0.16 U/mL.h for batch 1 when the fermentation time was above 220 h, and hydrolysis at temperatures around 58 °C. The region that delimits a hydrolysis rate immediately below this value was 0.11 U/mL.h. The latest was approximately 30% less than the highest value found.

ii) The highest hydrolysis rate was 0.29 U/mL.h for batch 2, for fermentation observed after approximately 200 h for enzymes subjected to hydrolysis at temperatures around 40 °C. When compared to batch 1, an increase of over 80% for the hydrolysis rate was observed.

iii) The condition for achieving the highest hydrolysis rate (0.075 U/mL.h) was established after 200 h fermentation time for starch hydrolyzing enzymes when the temperature was in the range of 40-44 °C. This result was approximately 47% of the value obtained for the hydrolysis rate obtained in batch 1, and approximately 26% of the value obtained in batch 2. One possible explanation for this result is that the aeration could have influenced the low hydrolysis efficiency response observed for the enzymes produced in batch 3.

Single batch amylase production processes cause metabolic stresses related to substrate scarcity conditions, as starch hydrolysis products, particularly glucose, are obtained only after a series of steps involved in the degradation of glycosidic bonds, components amylose, and amylopectin chains. Thus, the partial release of glucose molecules can cause high competitiveness of cells by the substrate, keeping the concentration of this monosaccharide at always low levels. To compensate for the low levels in glucose concentration, cells might create genetic devices by spontaneous mutation due to stress and may express a previously unseen condition, such as the production of enzymes with greater activity. Enzymes synthesized by yeast can partially hydrolyze starch, such as starch phosphorylase (EC: 2.4.1.1), and can generate amylose, although it might be in concentrations insufficient to meet the metabolic needs of the microorganism.

Figure 2.6 - Response surface and contour curve resulting from the derivation of the fitting equations from the experimental data. A.1, response surface for Batch 1; B.1, response surface for Batch 2; C.1, response surface for Batch 3; A.2, contour curve for Batch 1; B.2, contour curve for Batch 2; C.2, contour curve for Batch 3.



On the other hand, due to substrate scarcity conditions and subsequent mutation, enzymes such as glucoamylase (EC: 3.2.1.3), responsible for total starch hydrolysis to α -D-

glucose, might be synthesized and create favorable conditions for microbial growth. And so, if there is sufficient glucose in the medium and considering the concept of intercellular chemical transmitters, the enzymes may have inhibited synthesis, or may be consumed by the microorganism itself due to protease synthesis, as reported by Chaud et al. (2016), Baur et al. (2015) and Younes et al. (2011).

Nevertheless, while available glucose declines, a new substrate shortage is established, and the mechanism restarts. This hypothesis can be adopted since the observation of the graphs generated from the experimental data and the mathematical modeling used suggested a series of increases and decreases of the enzymatic activities during the studied fermentation time. Consequently, enzyme production and consumption of the generated enzymes could be considered. In the absence of degradation of the synthesized enzymes, the enzymatic activity values would be increasing due to the concentration of these amylases also growing.

In summary, the figures obtained by the mathematical modeling provided a visual representation of the behavior of EA in each different batch. Additionally, careful observation and interpretation of those graphs offered valuable information for better decision-making when selecting the most suitable process conditions to obtain the required enzymatic activity.

2.6 Conclusion

The conditions for time and temperature used in batch 1 showed to be suitable for obtaining amylases, given that an enzyme activity value of 3.6 U/mL was achieved at a fermentation time of around 50 h when these enzymes were subjected to a hydrolysis temperature of around 48 to 52 °C. However, considering the requirements for the amylase complex, a condition of higher enzymatic activity, 4.2 U/mL, was achieved under two other conditions: around 150 h and above 200 h. In batch 2, the condition for the production of the enzymes with the highest activity among all conditions studied (9.19 U/mL) was the most suitable since the objective of the process was to obtain amylase complexes with higher enzymatic activity. Therefore, the synthesis of amylases under the conditions established in batch 2, and fermentation time of approximately 120 h was indicated. However, for batch 3, it appears that there was a reduced ability to synthesize amylases with enzymatic activities of interest. This effect may be related to the transfer of oxygen to the reaction medium, a fundamental ingredient for growth where starch degradation processes could be accelerated.

From the derivatives of the mathematical modeling equations, the optimal condition for the productivity of amylases was observed in batch 2 after 200 h of fermentation for hydrolysis processed at temperatures around 40 °C. Under those conditions, maximum rates of enzymatic activity can be obtained when applying a steady state of the process and consequent maintenance of the productive potential of amylases. In summary, the results here presented showed that the modeling presented assisted in selecting the most suitable conditions for achieving the required enzymatic activity. The methodology presented could be applied in industry and research settings in order to facilitate the steady and efficient production of amylase. Furthermore, the same conditions presented here can be used to study and produce other enzymes.

2.7 References

Journal Articles:

- Abrams, E. M., & Gerstner, T. V. (2015). Allergy to cooked, but not raw, peas: A case series and review. *Allergy Asthma and Clinical Immunology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1186/s13223-015-0077-x>
- Adam, A. C., Latorre-García, L., & Polaina, J. (2004). Structural analysis of glucoamylase encoded by the STA1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). *Yeast*, 21(5), 379-388. <https://doi.org/10.1002/yea.1102>
- Amorim, T. S., de Brito Lopes, S., Bispo, J. A. C., Bonafe, C. F. S., de Carvalho, G. B. M., & Martínez, E. A. (2018). Influence of acerola pulp concentration on mead production by *Saccharomyces cerevisiae*. *AWRI 796. LWT - Food Science and Technology*, 97, 561-569. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.009>
- Araque, E.; Parra, C.; Rodriguez, M.; Freer, J.; Baeza, J.. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 43, p.120–123, 2008. <https://doi.org/10.016/j.enzmictec.2008.02.007>
- Avwioroko, O. J., Anigboro, A. A., & Tonukari, N. J. (2016). Biotechnological application of cassava-degrading fungal (CDF) amylase in broiler feed formulation. *Biotechnology Journal International*, 1-12. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/20614>

Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23-29. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5645>

Bispo, J. A., Bonafe, C. F., Santana, K. M., & Santos, E. C. (2015). A comparison of drying kinetics based on the degree of hydration and moisture ratio. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 192-198. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.014>

Bispo, J. A., Bonafe, C. F., Silva, M. L., Andrade, I. H., & Carvalho, G. B. (2014). Applying structural transition theory to describe enzyme kinetics in heterogeneous systems. *Journal of Mathematical Chemistry*, 52(6), 1497-1513. <https://doi.org/10.1007/s10910-014-0325-1>

Bispo, J. A. C., Bonafe, C. F. S., Koblitz, M. G. B., Silva, C. G. S., & de Souza, A. R. (2013). Substrate and enzyme concentration dependence of the Henri–Michaelis–Menten model probed by numerical simulation. *Journal of Mathematical Chemistry*, 51(1), 144-152. <https://doi.org/10.1007/s10910-012-0071-1>

Chaud, L. C., Lario, L. D., Bonugli-Santos, R. C., Sette, L. D., Junior, A. P., & Felipe, M. d. G. d. A. (2016). Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, 33(6), 807-814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.016>

Demirkan, E S , Mikami, B , Adachi, M , Higasa, T , Utsumi, S α -amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry* 40 2629-2636, 2005

Gressman, P. T., & Strain, R. M. (2010). Global classical solutions of the Boltzmann equation with long-range interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(13), 5744-5749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001185107>

Hernández, M. S., Rodríguez, M. R., Guerra, N. P., & Rosés, R. P. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of food engineering*, 73(1), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.009>

Kondo, A., Shigechi, H., Abe, M., Uyama, K., Matsumoto, T., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kishimoto, M., & Fukuda, H. (2002). High-level ethanol production from starch by a

flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 291-296. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0900-9>

Kumari, N., Sushil, R., Rani, N., Malik, K., & Avtar, R. (2019). Microbial amylases: An overview on recent advancement. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(1), 198-205.

Laitila, A., Wilhelmson, A., Kotaviita, E., Olkku, J., Home, S., & Juvonen, R. (2006). Yeasts in an industrial malting ecosystem. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 953-966. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0150-z>

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Palukurty, M. A., & Somalanka, S. R. (2016). Optimization of nutritional parameters for production of alpha amylase using *Aspergillus oryzae* MTCC 3017 by central composite design. *Int J Ind Biotechnol Biomaterial*, 2, 1-10.

Peixoto, A. B., de Almeida, N. A., & Mauger, F. (2013). Bioetanol de fonte amilacea produzido por leveduras silvestres. *Revista de Biotecnologia & Ciência (ISSN 2238-6629)*, 2(2), 25-39.

Ryan, R. P., & Dow, J. M. (2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends in Microbiology*, 19(3), 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.12.003>

Woo, D. K., Phang, T. L., Trawick, J. D., & Poyton, R. O. (2009). Multiple pathways of mitochondrial-nuclear communication in yeast: intergenomic signaling involves ABF1 and affects a different set of genes than retrograde regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(2), 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2008.09.008>

Yajima, A. (2014). Recent progress in the chemistry and chemical biology of microbial signaling molecules: quorum-sensing pheromones and microbial hormones. *Tetrahedron Letters*, 55(17), 2773-2780. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.03.051>

Younes, B., Cilindre, C., Villaume, S., Parmentier, M., Jeandet, P., & Vasserot, Y. (2011). Evidence for an extracellular acid proteolytic activity secreted by living cells of *Saccharomyces*

cerevisiae PlR1: impact on grape proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(11), 6239-6246. <https://doi.org/10.1021/jf200348n>

Books:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>. Accessed in april 5th, 2021

Rodrigues, M.I., & Iemma, A.F. (2014). *Experimental Design and Process Optimization* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b17848>

Thesis:

HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Campinas, **Tese de Doutorado** – UNICAMP, 2006

Capítulo 3 - Otimização da Produção de Bioetanol a partir de Amido por Leveduras Silvestres em Batelada Simples

Artigo publicado na Revista de Biotecnologia & Ciência

PEIXOTO, A. B., BISPO, J. A. C., BONAFE, C. F. S., MARTÍNEZ, E. A. Modelagem e superfície de resposta da produção de bioetanol a partir de amido por leveduras silvestres em batelada simples. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 6, n. 2, 2017.

Modelagem e superfície de resposta da produção de bioetanol a partir de amido por leveduras silvestres em batelada simples

Modeling and response surface on bioethanol production from starch by wild yeasts in batch fermentation

Abraão Brito Peixoto¹, José Aílton Conceição Bispo², Carlos Francisco Sampaio Bonafé³, Ernesto Acosta Martínez⁴

¹Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS); Departamento de Tecnologia. Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte CEP 44036-900 - Feira de Santana – Bahia, Telefone: (75) 3161-8056, abraaopeixoto@uefs.br; ² Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS); Departamento de Tecnologia. Avenida Transnordestina, s/n -Novo Horizonte CEP 44036-900 - Feira de Santana – Bahia, Telefone: (75) 3161-8056, ailton_bispo@hotmail.com; ³Professor da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Rua Monteiro Lobato, 255, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970 - Campinas – SP, Telefone: (19) 37886135, Fax: (19) 37886129, bonafe@unicamp.br; ⁴Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS); Departamento de Tecnologia, Programa da Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Biologia (DCBIO). Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte CEP 44036-900 - Feira de Santana – Bahia, Telefone: (75) 3161-8056, ernesto.amartinez@yahoo.com.br

3.1 Resumo

O bioetanol compreende os processos de obtenção do etanol em que a matéria-prima é a biomassa, tal como celulose, cana-de-açúcar ou milho. Este trabalho objetivou investigar o comportamento de leveduras sob fermentação em batelada simples para produção de etanol a partir de amido e analisar as condições de processo para maximizar a concentração deste álcool. O ajuste matemático foi inspirado na Equação de Transporte de Boltzmann. Na reação sem aeração, o valor máximo foi de 0,81 g/L de etanol, menos da metade do valor obtido sob aeração (1,64 g/L). As aproximações obtidas denotaram altos valores para os coeficientes de determinação calculados. A estratégia de modelagem demonstra possibilidade de estudo de variáveis de processo mesmo em condições de escassez de fatores. A equação de ajuste explica de maneira harmônica o comportamento observado em bancada e permite avaliação do processo para a produção de etanol a partir da biomassa em maiores escalas.

Palavras-chave: biomassa, otimização, segunda geração, amilase

3.2 Abstract

Bioethanol comprises all the processes for obtaining ethanol in which the raw material is biomass such as cellulose, sugar cane or corn. This work aimed to investigate the behavior of yeast strain under simple batch fermentation to produce ethanol from starch and to analyze the process conditions to maximize ethanol. The Boltzmann's Transport Equation inspired the fitting. The maximum ethanol concentration was 0.81 g/L, less than half of the maximum concentration of ethanol obtained under aeration (1.64 g/L). The approximations through the mathematical model denoted high values for the R^2 calculated for each process condition. The modeling strategy demonstrates the possibility of studying process variables even under conditions of factor shortage. The adjustment equation explains in a harmonic way the behavior observed in the laboratory and allows evaluation of the process for the production of ethanol in large scale.

Keywords: biomass, optimization, second generation, amylase

3.3 Introdução

A produção de álcool no Brasil na safra 2014/2015 foi de mais de 28 bilhões de litros e na safra 2015/2016, de mais de 30 bilhões de litros (UNICA, 2017). Tem-se hoje mais de 10 milhões de hectares de cana-de-açúcar plantados, sendo que a área colhida em 2015 foi de 9,7 milhões de hectares. As exportações consolidaram um volume de 130 milhões de litros para a União Europeia e de 4 milhões de litros para o CBI (Caribbean Basin Initiative). A meta até o final do ano 2017 é alcançar níveis ainda maiores de produção.

Hoje em dia, o etanol oriundo do milho é produzido quase que exclusivamente do amido retido na semente do grão. Estudos de produção alcoólica a partir de grãos de milho são realizados desde a década de 80 (TORNEY et al. 2007). Avanços e entendimentos mais aprofundados podem, contudo, providenciar aumento significativo na produtividade em detrimento de práticas atuais.

KIM & DALE (2004) comparam dados sobre produção alcoólica a partir de distintos cultivares e demonstram que milho, arroz e cana-de-açúcar apresentam os maiores rendimentos (0,46; 0,48 e 0,50 L/Kg de massa seca respectivamente). Aproximadamente 5 % de todo milho produzido no mundo são desperdiçados, o que poderia gerar 9,3 GL de etanol.

A produção de etanol a partir da glicose derivada da degradação do amido tem sido dominada pela utilização de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, o açúcar derivado da biomassa é uma mistura de hexoses (essencialmente a glicose) e pentoses (essencialmente a xilose) e muitas cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não degradam a xilose. Uma saída utilizada é adição às leveduras de microrganismos etanológicos que degradem a xilose ou a manipulação por engenharia genética com mecanismo de expressão gênica de modo que um só microrganismo degrade tanto as hexoses quanto as pentoses. Para o primeiro caso, pesquisas revelam que é possível a utilização de leveduras e bactérias, como a *Zymomonas mobilis* para a degradação da xilose residual (DIEN et al., 2003); para o segundo caso, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido manipuladas geneticamente de maneira que tenham a capacidade de degradar ambos os carboidratos pela adição de genes de *Pichia stipitis* (JEFFRIES & JIN, 2004).

O foco de estudos relativos à produção do bioetanol está na redução dos custos tanto da produção dos biorreatores quanto do processo. Para isso, o pré-tratamento se faz necessário e pode representar uma porção significativa na análise de custos. Dessa forma, a compreensão de informações que denotam a importância, as estratégias e as operações unitárias envolvidas nos pré-tratamentos são essenciais.

GUMIENNA et al. (2016) trabalharam com 258 variedades de amostras de grãos de milho para a produção de bioetanol, cujos teores de amido variavam de 610,67 a 721,41 mg/g e açúcares redutores, de 3,83 a 10,76 mg/g. O milho triturado foi sacarificado com α -amilase (0,2 mL/Kg de grãos) e glicoamilase (0,6 mL/Kg de grãos) e então levado à fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* de destilaria. Ainda, foi adicionado um complexo de xilanase e celulase (0,08 mL/Kg de grãos) e protease GC 106 (0,08 mL/Kg de grãos). O rendimento máximo obtido foi 81,33 % do valor teórico. O processo fermentativo teve pH ajustado para 5,0-5,5 e os grãos adicionados como fonte de carbono foram misturados com água na proporção de 1:6. Antes da inoculação, o meio com os grãos passou por cocção a 100 °C por 1 h para gelatinização do amido. A seguir, com o decréscimo da temperatura, as enzimas atuaram na degradação do amido original em processo de sacarificação, cujos índices variaram de 88,57 % a 57,90 %. Foi notado que as amostras de grãos de milho com maior teor de amido foram aquelas que denotaram menor eficiência de sacarificação (-0,35; $p < 0,05$). Os maiores níveis de açúcares redutores nos grãos levaram a uma maior produtividade de etanol, sendo que comparações em grupos, por meio de técnicas exploratórias multivariáveis, permitiram a

distinção dos maiores rendimentos em etanol em que se observou valor máximo (35,6 L de etanol por 100 Kg de grãos) quando o índice de sacarificação foi máximo. Este trabalho demonstra que não é apenas o teor de amido no grão que denota maior rendimento na fermentação para a produção de etanol.

SUWANNARAT & RICHIE (2015) trabalharam com *Saccharomyces cerevisiae* em processo fermentativo anaeróbico para degradação da matéria orgânica de resíduos de alimentos oriundos de restaurantes, dentre outros. Foram determinadas as condições ótimas de processo, que durou até 30 dias. Os autores perceberam que a degradação efetiva do efluente se daria mesmo com materiais com concentração de 700 g de resíduos de alimentos/L. A concentração celular ótima para a inoculação foi determinada e seu valor foi de aproximadamente $4,6 \cdot 10^7$ células/L de inóculo. A temperatura de processo foi otimizada em torno de 40 °C enquanto os estudos foram executados na faixa de 25 a 40 °C. A DQO e a DBO foram reduzidas de aproximadamente 30 e 50 % respectivamente. Foi detectado que as leveduras utilizaram praticamente todo açúcar disponível e reduziram lipídios e proteínas em torno de 50 %. Com relação ao amido, sua degradação se deu após um longo período de fermentação, superior a 20 dias, e chegou a mais de 50 % de hidrólise na condição ótima do processo e numa taxa de inoculação de 10 mL de inóculo para 175 mL de cultura. Contudo, os autores concluem que as leveduras foram efetivas na degradação dos resíduos alimentares, mas a liberação de CO₂ e a produção de etanol (aproximadamente 1,5 %) foram significativas apenas nos primeiros 7 dias de incubação.

WU et al. (2016) trabalharam com resíduos de inhame (*Colocasia esculenta*), notadamente com quantidade apreciável de amido. Este material foi utilizado como única fonte de carbono para a produção de bioetanol por *Kluyveromyces marxianus* K21 termotolerante em frascos agitados de 250 mL. Em relação à fonte de carbono, os autores consideraram que a condição ótima seria de 170 g de resíduos de inhame/L de meio fermentativo, o que geraria, após a hidrólise, glicose na concentração de aproximadamente 100 g/L e 9 g/L de glúten de milho como fonte alternativa de nitrogênio. Em processos em que ocorreram simultaneamente a sacarificação e a fermentação, houve alta produtividade de etanol em detrimento de processos em que ocorreram a sacarificação e a fermentação dissociadas. A condição ótima de inóculo no processo simultâneo foi de 5 % de *Kluyveromyces marxianus* K21 a 40 °C e 150 rpm com obtenção máxima da concentração de etanol de 48,98 g/L e produtividade de 2,23 g/L.h após 22 h de cultivo. Experimentos de ampliação de escala em biorreatores de 5 L demonstraram que

a cepa estudada pode manter sua capacidade. Os autores observaram que após 22 h de cultivo foram alcançados uma concentração de etanol de 43,78 g/L e uma produtividade de 2,19 g/L.h, correspondendo a 94,2 % do rendimento teórico em etanol.

CHU-KY et al. (2016) trabalharam em escala de bancada e em escala piloto com fermentação convencional e do tipo “*very high gravity*” (VHG), respectivamente, a partir de amido de arroz, na forma de farinha de arroz, cuja concentração foi de 186,9 g/L (fermentação convencional) e de 311,5 g/L (VHG), para produção de etanol potável por *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de $1,75 \cdot 10^7$ células/mL (fermentação convencional) e de $3,5 \cdot 10^7$ células/mL (VHG) para a condição de inóculo. O processo fermentativo do amido original foi precedido pelas etapas simultâneas de liquefação e sacarificação por meio das enzimas α -amilase, β -glucanase e glicoamilase com auxílio de proteases. O cultivo ocorreu a uma temperatura de 30 °C num único fermentador. O meio reacional foi suplementado de fosfato de potássio (4,8 mM) e ureia (16,0 mM) e a reação ocorreu por 120 h, obtendo-se uma concentração máxima de etanol de 17,6 % (v/v), o que corresponde a 86,3 % do rendimento teórico em etanol. Após a ampliação de escala para 25 L, o conteúdo de etanol passou a ser de 17,0 %, o que corresponde a um rendimento de 83,2 % do rendimento teórico em etanol. Os subprodutos não fermentescíveis, tais como proteínas (47,5 %) e fibras (15,8 %) foram separados por meio de filtros de placas após a fermentação e, então, encaminhados para secagem, onde foram condicionados para serem utilizados como ração animal.

O presente trabalho teve o objetivo de investigar o comportamento das leveduras silvestres ainda não catalogadas submetidas à fermentação em batelada simples para produção de etanol cuja única fonte de carboidrato foi o amido. Condições ótimas de processo, particularmente pressão parcial de oxigênio (pO_2) e tempo, foram obtidas para maximizar a concentração de etanol no meio reacional. A ferramenta utilizada para o estudo das condições é demonstrada pelos trabalhos de BISPO et al. (2013), BISPO et al. (2014) e BISPO et al. (2015), associado à Equação de Transporte de Boltzmann para a definição da equação de ajuste.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Aquisição das cepas de leveduras

A cepa de levedura aqui estudada, LEB-AAQ5B, é um exemplar de bioprospecção obtido em trabalhos anteriores entre 390 cepas de leveduras componentes do Banco de Células

do Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMeB/Unicamp), como descrito por PEIXOTO et al. (2013).

3.4.2 Meio reacional para fermentação

Amido solúvel (75,0 g/L), KH_2PO_4 , (5,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g/L) e extrato de levedura (1,0 g/L). O pH foi ajustado para 5,5 com HCl 0,5 N. Essa composição foi utilizada para todos os processos estudados.

3.4.3 Fermentador

O reator utilizado foi o biorreator automatizado Bioflo III, (New Brunswick, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com cuba de fermentação de volume útil de 1,0 L. Os agitadores utilizados foram do tipo turbina de Rushton, na base do eixo de agitação, e hélice naval, superior àquela. Sondas de pH e pO_2 Mettler Toledo (Greifensee, Suíça). Filtros microbiológicos para ar comprimido com poros de 0,22 μm .

3.4.4 Processos fermentativos

Os processos fermentativos foram divididos em duas bateladas distintas. A primeira, sem aeração e a segunda, com aeração de 1,0 vvm durante todo o processo. A agitação foi mantida constante em 150 rpm e a temperatura em 30 °C.

3.4.5 Amostragem

Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 h. O meio fermentado foi submetido à centrifugação de 15000 rpm a 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi reservado e filtrado por meio de poros de 0,22 μm para análise da concentração de etanol presente no meio.

3.4.6 Análise da concentração de etanol

O sobrenadante reservado foi injetado em HPLC, coluna HPX-87H (Bio-Rad®, Berkeley, Califórnia, Estados Unidos da América) para quantificação do etanol produzido a partir do amido original.

3.4.7 Condições da Modelagem Matemática

Seguindo a proposta de BISPO et al. (2013), com considerações apontadas em trabalhos posteriores, como exibido por BISPO et al. (2014) e BISPO et al. (2015), associada a estudos de aproximações sucessivas inspiradas na Equação de Transporte de Boltzmann, foram ajustados 11 pontos experimentais. A equação de ajuste descreve o comportamento observado por meio dos dados experimentais em cada condição de processo. A concentração de etanol foi

relacionada aos parâmetros de tempo de fermentação e pressão parcial de oxigênio (pO_2). Com a derivação da equação de ajuste em relação ao tempo, foram calculados os valores de produtividade (g/L.h) ao longo do tempo de fermentação. Esses valores de produtividade também foram relacionados ao tempo de fermentação e à aeração do meio (pO_2). O software utilizado para o tratamento dos dados pela equação de ajuste foi o Matlab R2014a (Natick, Massachusetts, Estados Unidos da América).

3.5 Resultados e Discussões

Por meio da Figura 3.1A, observa-se a construção gráfica dos dados experimentais obtidos para a produção de etanol pela cepa de levedura LEB-AAQ5B nas condições de 0,0 e 1,0 vvm de aeração. A Figura 3.1B representa os ajustes obtidos com a utilização da metodologia descrita para o estudo do processo. No processo estabelecido sem aeração, percebe-se início da produção de etanol após 24 h de fermentação. Contudo, ao se estabelecer aeração de 1,0 vvm, a produção de etanol passa a ser observada apenas depois de decorridas aproximadamente 150 h. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de a presença de oxigênio no meio reacional estimular a produção de energia pelas leveduras via cadeia transportadora de elétrons, mais produtiva em comparação com a via fermentativa. Todavia, a ausência de glicose no meio, ainda no início da fermentação, faz estender-se a fase de latência, provavelmente devido à adaptação das leveduras, levadas ao estresse pela baixa concentração de substrato e posterior desenvolvimento de habilidade para sintetizar as enzimas necessárias à degradação da molécula de amido.¹

¹ Parágrafo suprimido da versão original do artigo publicado.

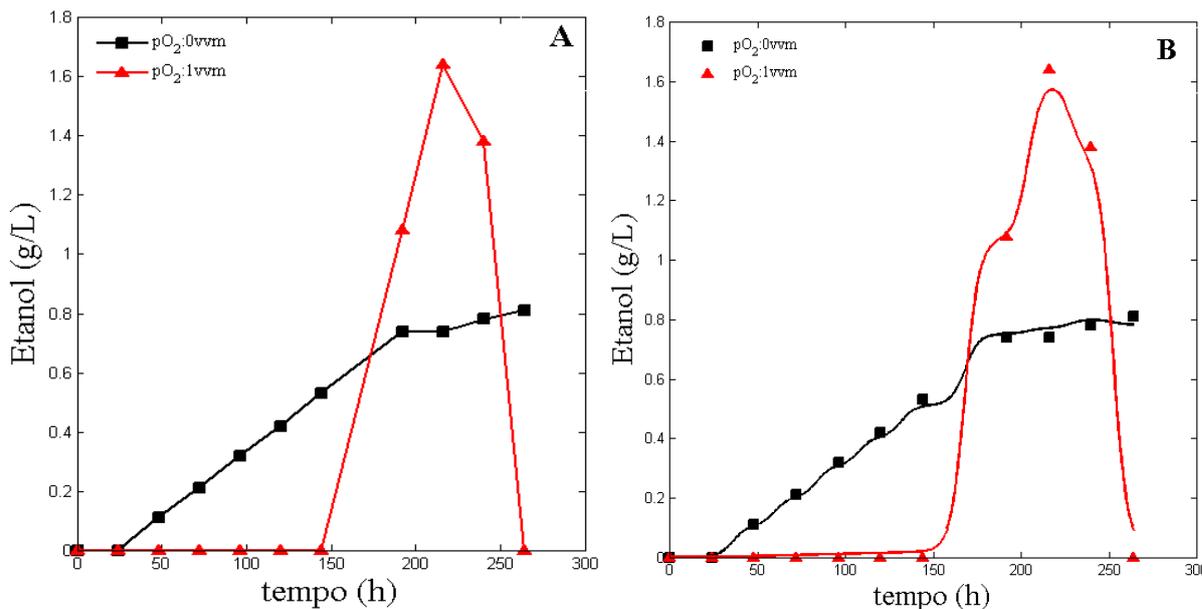


Figura 3.1- Dados experimentais obtidos para a concentração de etanol (A) nas condições sem aeração (■) e com aeração de 1,0 vvm (▲) e a aproximação observada por meio do modelo matemático adotado para o estudo do processo (B).

Por outro lado, quando o processo se dá na ausência de oxigênio, o mecanismo de adaptação é acelerado, já que os fatores bioquímicos associados à atividade metabólica das leveduras em baixa tensão de oxigênio ativam prematuramente as vias de síntese das enzimas amilolíticas, concatenadas à obtenção de energia pela via glicolítica a partir da glicose oriunda da hidrólise do amido, produzindo etanol, subproduto de todo o processo.

Embora a fase de latência tenha se prolongado até aproximadamente 150 h de fermentação no experimento sob aeração de 1,0 vvm, percebe-se, após este tempo, um aumento significativo na produção de etanol. Esta desenvoltura, deve-se, principalmente, pela alta concentração de leveduras no meio (dados não demonstrados), levando a uma redução da concentração do oxigênio dissolvido no meio reacional e, desse modo, ativando os mecanismos de obtenção de energia por via glicolítica e, por conseguinte, liberando etanol. Esse cenário se estende até o tempo de aproximadamente 240 h, a partir do qual observa-se o consumo do etanol produzido, talvez devido à habilidade destes microrganismos em assimilar o etanol como fonte de carbono, como se observa em bactérias acéticas, produzindo ácido acético. Este argumento ganha mais robustez pelo fato de a concentração de ácido acético medida ter sido de 4,45 g/L (dados não demonstrados) após 264 h de fermentação, ao passo em que este produto não foi detectado até 192 h de reação.

A Figura 3.2 e a Figura 3.3 demonstram as aproximações matemáticas e os resíduos calculados nas condições experimentais sem aeração e sob aeração de 1,0 vvm respectivamente.

Nesses casos também foram demonstrados os valores do coeficiente de determinação (R^2), afim de serem avaliadas estatisticamente o quanto dos dados experimentais pode ser explicado pelo modelo de ajuste.

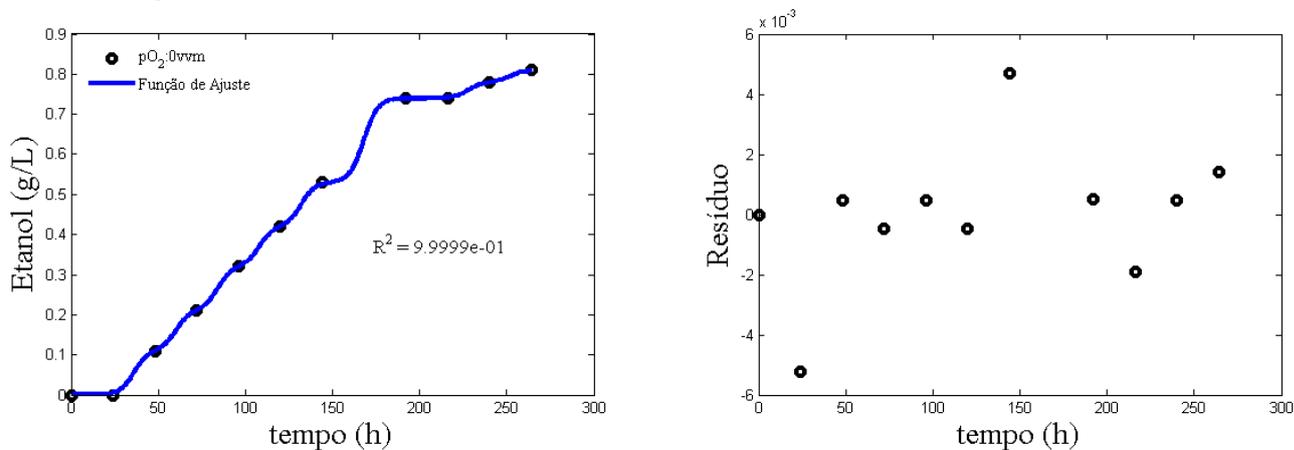


Figura 3.2 – Ajuste dos pontos experimentais por meio do modelo matemático adotado para o estudo (à esquerda) e os resíduos calculados para cada ponto experimental (à direita) na condição de reação sem aeração

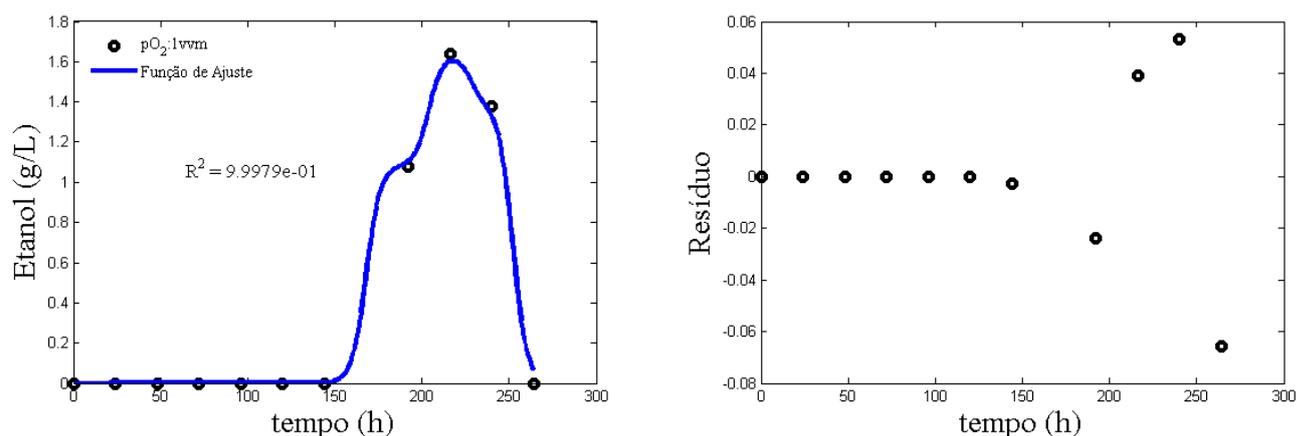


Figura 3.3 – Ajuste dos pontos experimentais por meio do modelo matemático adotado para o estudo (à esquerda) e os resíduos calculados para cada ponto experimental (à direita) na condição de reação sob aeração de 1,0 vvm.

Com relação ao ajuste alcançado por meio da estratégia de aproximação matemática adotada, observa-se uma relação direta entre os dados experimentais obtidos em bancada e o comportamento da equação adotada para o ajuste. Os valores dos coeficientes de determinação foram 0,9999 e 0,9998 para as condições sem aeração e sob aeração de 1,0 vvm respectivamente. Esses valores denotam harmonia entre os dados experimentais e o modelo matemático e permite ao pesquisador investigar mais profundamente os fenômenos envolvidos na produção de etanol pelas leveduras, levando em consideração a confiabilidade dispensada à modelagem matemática, preditora do comportamento extraído em bancada.

Derivados dos altos valores de R^2 , observam-se valores residuais, erro entre o valor observado em bancada e o valor predito pelo modelo, inferiores a $4,0 \cdot 10^{-3}$ g/L e $7,0 \cdot 10^{-2}$ g/L para as condições de aeração de 0,0 vvm e 1,0 vvm respectivamente. A partir desta avaliação inicial do ajuste dos dados experimentais ao modelo matemático foi possível a obtenção da superfície de resposta. Para isso, foi realizada uma correlação simultânea entre os parâmetros de tempo de fermentação, pressão parcial de oxigênio (pO_2) e a resposta, concentração de etanol. Este procedimento seguiu uma simulação baseada no modelo matemático adotado, inspirado na Equação de Transporte de Boltzmann, inclusive para aquelas condições experimentais não contempladas experimentalmente, mas dentro da faixa paramétrica estudada (Figura 3.4).

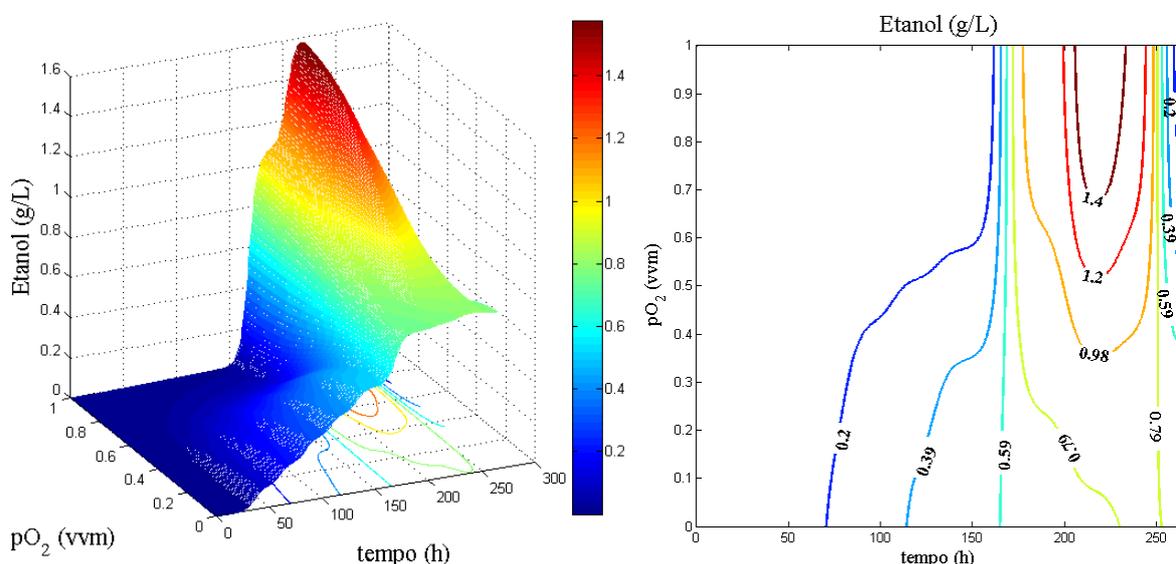


Figura 3.4 - Superfície de resposta (à esquerda) e curva de contorno (à direita) para a concentração de etanol produzido pela linhagem LEB-AAQ5B nas condições experimentais estabelecidas para aeração de 0,0 e 1,0 vvm.

Analisando-se a superfície de resposta, pode-se verificar a existência de regiões de máxima concentração de etanol em relação aos parâmetros de tempo e pO_2 . Este mecanismo de avaliação experimental permite a observação dos pontos paramétricos da reação em que, tendo sido observados os valores de menor gasto energético, tais como menor vazão de aeração, menor tempo de fermentação etc., mantém-se a resposta na região considerada estatisticamente ótima, dentro da faixa estudada.

Entende-se como condição ótima aquela em que os parâmetros tempo e pO_2 sejam os menores possíveis, dentro da faixa estudada, onde se obtém os maiores valores de concentração de etanol. Para as condições experimentais estudadas em associação à análise das curvas de

contorno obtidas, a condição estatisticamente mais apropriada à produção de etanol pelas leveduras seria uma fermentação de aproximadamente 210 h com aeração de aproximadamente 0,7 vvm, cuja relação estaria dentro da região de concentração máxima. Todavia, o maior valor de concentração de etanol observado em bancada foi de 1,64 g/L após um tempo de fermentação de 216 h. Esse valor de concentração de etanol é aproximadamente 17 % maior que aquele apontado dentro da região ótima (1,4 g/L), mas sob aeração de 1,0 vvm.

Após a obtenção das superfícies de resposta a partir da equação que prediz o comportamento dos parâmetros diante do processo, as condições de máxima produtividade foram obtidas derivando-se essas equações de ajuste em relação ao tempo para se determinar o ponto crítico (Figura 3.5).

O ponto crítico observado nas superfícies obtidas da derivação da equação de ajuste nos permite melhor entendimento do processo. Pode-se interpretar as condições do processo a partir do princípio da velocidade de formação de moléculas de etanol por hora de reação, interpretação da produtividade (g/L.h). Interpretam-se os pontos de máximo observados nas superfícies como sendo o ponto em que a velocidade de formação é máxima, sendo este o ponto ideal para manutenção dos parâmetros de processo com vistas ao prolongamento das condições de produção máxima. Nesses pontos, poder-se-iam sugerir processos fermentativos por meio de bateladas alimentadas para garantir condições permanentes da produção de etanol em estado estacionário.

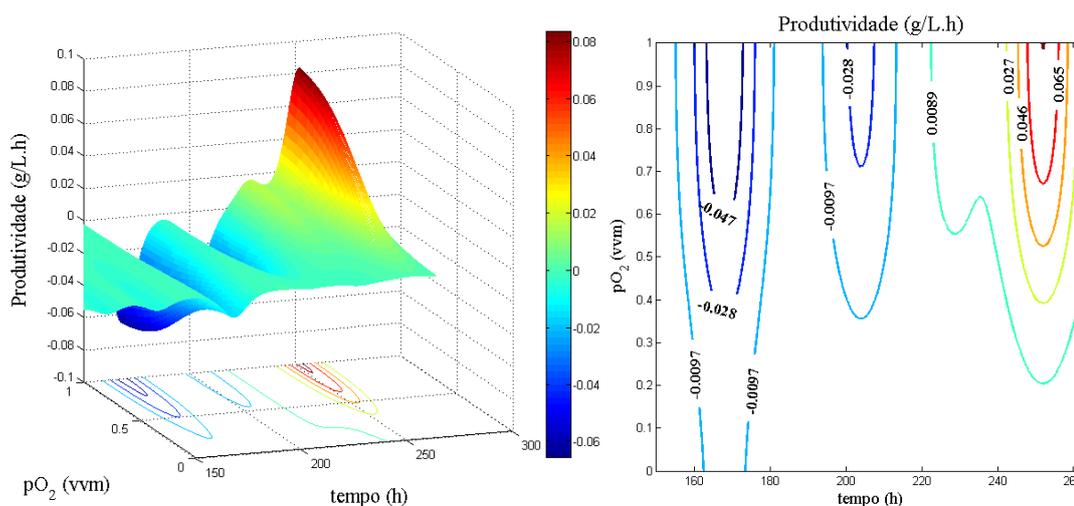


Figura 3.5 - Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de contorno (à direita) resultantes da derivação das equações de ajuste dos dados experimentais relativos às bateladas nas condições estudadas.

O ponto de máxima produtividade (0,083 g/L.h) é obtido após um tempo e fermentação de 250 h sob aeração de aproximadamente 1,0 vvm, tempo em que, tendo sido mantidas as condições do meio reacional, ter-se-ia a produção de etanol em estado estacionário. O mecanismo para iniciar a entrada no estado estacionário poderia ser a relação com concentração de oxigênio dissolvido no meio reacional, indício de uma possível fase de crescimento celular exponencial, causador de escassez de oxigênio e, por consequência, do aumento do valor da concentração de etanol. A manutenção do estado estacionário se daria pela retirada gradativa dos produtos gerados na mesma taxa em que são sintetizados de modo a permitir uma permanência das condições bioquímicas da reação com vistas ao prolongamento das condições metabólicas dos microrganismos.

3.6 Conclusões

Os processos de produção de etanol em batelada simples causam estresses metabólicos relativos às condições de escassez de substrato e formação de produto. A glicose, obtida apenas depois de uma série de etapas envolvidas na degradação das ligações glicosídicas, componentes das cadeias de amilose e amilopectina, mantém-se em baixa concentração, dada a extensão de reações para sua obtenção em detrimento do consumo imediato pelos microrganismos. Por outro lado, a formação de etanol causa uma modificação metabólica nas células, pois se trata de um produto tóxico aos microrganismos e, em determinadas condições, pode inviabilizar o processo.

Válido observar a possibilidade de mutação espontânea causada pelo estresse metabólico devido à escassez de substrato, potencial causador de efeitos metabólicos inesperados, tais como a formação de produtos estranhos ou o consumo do etanol gerado, como foi observado em bancada neste trabalho.

Diante do cenário apresentado, pode-se concluir como segue:

i) A equação de ajuste adotada para a modelagem matemática dos dados experimentais explica de maneira harmônica o comportamento obtido na observação em bancada e permite avaliar as regiões consideradas ótimas para a produção de etanol sob condição experimental

variando de 0,0 a 1,0 vvm para a vazão de ar comprimido, dentro de um tempo de processo de até 264 h.

ii) O consumo do etanol produzido na condição de fermentação sob aeração de 1,0 vvm após 240 h pode ter sido causado pelo estresse metabólico observado no início da reação, com extensa fase de latência, onde os microrganismos se adaptam às condições do meio, passam a produzir etanol após 150 h de fermentação e, pela escassez de substrato ou excesso de microrganismos, a via metabólica inesperada de consumo de etanol é ativada e este álcool tem concentração reduzida.

iii) Na condição experimental sem aeração, apesar de não ter sido observada redução nos valores da concentração de etanol, o valor máximo é de 0,81 g/L, correspondendo a menos da metade do valor da concentração máxima de etanol obtida sob aeração de 1,0 vvm. Assim, mesmo sob o risco do consumo do etanol produzido, a condição sob aeração deve ser adotada para a produção, desde que contemplada a modificação das condições de processo de batelada simples para batelada alimentada em processo contínuo a partir da detecção da redução da concentração de oxigênio no meio reacional, com vistas à manutenção do estado estacionário.

iv) As aproximações obtidas por meio do modelo matemático pode ser confiavelmente empregada, dados os valores calculados do coeficiente de determinação para cada condição de processo e dos resíduos para cada ponto experimental.

v) A estratégia de modelagem aqui apresentada demonstra, através da confecção da superfície de resposta, a possibilidade de estudo de variáveis de processo mesmo em condições de escassez de fatores. Neste experimento foram realizados processos em duas condições (0,0 vvm e 1,0 vvm), mas a geração de dados por meio da estratégia adotada revela o potencial desta ferramenta de análise estatística e abre um novo campo de estudos para simulação e otimização de processos ou, ainda, outras situações exorbitantes não exploradas, como melhoramento de imagens pelo ajuste matemático de pixels adjacentes, por exemplo.

vi) A superfície de resposta, em contraste com as curvas de contorno, revela as regiões de máxima produção de etanol e delimita essas regiões onde, tendo sido obedecidos os parâmetros de processo cujos pontos pertençam a ela, a produção máxima de etanol é garantida. Dessa forma, uma análise de custos em relação à aeração e tempo de fermentação pode ser realizada para garantir minimização dos gastos.

vii) A derivação da equação de ajuste em relação ao tempo de fermentação exprime a produtividade em etanol e denota fator importante para a consideração dos parâmetros de processo. Por meio da superfície da produtividade, observa-se a condição de manutenção do processo em estado estacionário quando se atinge a produtividade máxima (0,083 g/L.h) após 250 h, tempo em que se poderia lançar mão de um processo contínuo de modo a garantir as condições de formação de produto e degradação de substrato ali estabelecidas.

viii) Apesar de as leveduras ainda apresentarem baixa produtividade de etanol a partir de amido, ao contrário de algumas bactérias e fungos filamentosos, os estudos divulgados na comunidade científica apontam avanços significativos com utilização de engenharia genética, como nos trabalhos desenvolvidos por FAVARO et al. (2013) e FAVARO et al. (2015), ou melhoramentos das condições de processo, como demonstram ARUNA et al. (2014). As condições aqui apresentadas podem ser ainda extrapoladas para situações de utilização de cepas de leveduras associadas como, por exemplo, utilização de leveduras sabidamente amilolíticas, atuando na fase inicial do processo para a hidrólise do amido, em concomitância com leveduras sabidamente etanologênicas, consumidoras desse produto de hidrólise. Todavia, quando utilizadas apenas uma cepa para a realização da hidrólise e da produção de etanol, os rendimentos são invariavelmente baixos ou a duração do processo é muito longa. Neste cenário, JUODEIKIENE et al. (2014) demonstram como o mecanismo pode ser aplicado.

ix) É importante o estudo e prospecção de leveduras e outros microrganismos capazes de realizar as etapas aqui descritas, tendo em vista que os processos adotados industrialmente para a produção de etanol de segunda geração passam por uma etapa intermediária de hidrólise ácida, cujos efluentes impactam negativamente as condições ecológicas e, apesar de se mostrarem eficientes na obtenção do etanol, seus impactos são negligenciados. Os frutos desta negligência, contudo, serão observados em longo prazo, motivo pelo qual a bioprospecção de microrganismos capazes de hidrolisar os polímeros glicosídicos e transformá-los em insumos de interesse industrial com reduzido impacto sobre o meio ambiente deve ser incentivada.

3.7 Referências

ARUNA, A.; NAGAVALLI, M.; GIRIJASHANKAR, V.; PONAMGI, S. P. D.; SWATHISREE, V.; RAO, V. L. Direct bioethanol production by amylolytic yeast *Candida albicans*. *Letters in Applied Microbiology*. V. 60, p. 229-236, 2014

BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; KOBLITZ, M. G. B. ; SILVA, C. G. S.; SOUZA, A., RABELO. Substrate and enzyme concentration dependence of the Henri Michaelis Menten model probed by numerical simulation. *Journal of Mathematical Chemistry*, V. 51, p. 144-152, 2013

BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; SILVA, M. L. C.; ANDRADE, I. H. P.; CARVALHO, G. B. M. Applying structural transition theory to describe enzyme kinetics in heterogeneous systems. *Journal of Mathematical Chemistry*, V. 1, p. 1-16, 2014

BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; SANTANA, K. M. O. V.; SANTOS, E. C. A. A comparison of drying kinetics based on the degree of hydration and moisture ratio. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie /Food Science and Technology*, V. 60, p. 192-198, 2015

CHU-KY, S.; PHAM, T.-H.; BUI, K.-L. T.; NGUYEN, T.-T.; PHAM, K.-D., NGUYEN, H.-D. T.; LUONG, H.-N.; TU, V.-P.; NGUYEN, T.-H.; HO, P.-H.; LE, T.-M. Simultaneous liquefaction, saccharification and fermentation at very high gravity of rice at pilot scale for potable ethanol production and distillers dried grains composition. *Food and Bioproducts Processing*, V. 98, p. 79–85, 2016

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 63, p. 258-266, 2003

FAVARO, L.; JOOSTE, T.; BASAGLIA, M.; ROSE, S. H.; SAAYMAN, M.; GÖRGENS, J. F.; CASELLA, S.; VAN ZYL, W. H. Designing industrial yeasts for the consolidated bioprocessing of starchy biomass to ethanol. *Bioengineered*, V. 4:2, p. 97–102; 2013

FAVARO, L.; VIKTOR, M. J.; ROSE, S. H.; VILJOEN-BLOOM, M.; VAN ZYL, W. H.; BASAGLIA, M.; CAGNIN, L.; CASELLA, S. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnology and Bioengineering*, V. 112, n. 9, 2015

GRESSMAN, P. T.; STRAIN, R. M. Global classical solutions of the Boltzmann equation with long-range interactions. *PNAS*, V. 107, n. 13, p. 5744–5749, 2010

GUMIENNA, M.; SZWENGIEL, A.; LASIK, M.; SZAMBELAN, K.; MAJCHRZYCKI, D.; ADAMCZYK, J.; NOWAK, J.; CZARNECKI, Z. Effect of corn grain variety on the bioethanol production efficiency. *Fuel*. V. 164, p. 386–392, 2016

JUODEIKIENE, G.; CERNAUSKAS, D.; VIDMANTIENE, D.; BASINSKIENE, L.; BARTKIENE, E.; BAKUTIS, B.; BALIUKONIENE, V. Combined fermentation for increasing efficiency of bioethanol production from *Fusarium* sp. contaminated barley biomass. *Catalysis Today*. V. 223, p. 108–114, 2014

JEFFRIES, T. W. & JIN, Y.-S. Metabolic engineered for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* V. 63, p. 495-509, 2004

KIM, S. & DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*. V. 26, p. 361-375, 2004

PEIXOTO, A. B.; AGUJARO, N.; MAUGERI, F. Bioetanol de fonte amilácea produzido por leveduras silvestres. *Revista de Biotecnologia & Ciência*, V. 2, p. 25-39, 2013

PRAJAPATI, V.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. C. Bioethanol Production from the Raw Corn Starch and Food Waste Employing Simultaneous Saccharification and Fermentation Approach. *Waste Biomass Valor*, V. 6, p. 191–200, 2015

SUWANNARAT, J.; RITCHIE, R. J. Anaerobic digestion of food waste using yeast. *Waste Management*. V. 42, p. 61–66, 2015

TORNEY, F.; MOELLER, L.; SCARPA, A.; WANG, K. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Current Opinion in Biotechnology*, V. 18, p. 193-199, 2007

UNICA – União da Indústria de Cana de Açúcar. In: Acompanhamento da Safra. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 26 ago. 2017

WU, W.-H.; HUNG, W.-C.; LO, K.-Y.; CHEN, Y.-H.; WAN, H.-P.; CHENG, K.-C. Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. *Bioresource Technology*, V. 201, p. 27–32, 201

Capítulo 4 - Crescimento de *Myriangium* sp. em meio Sabouraud: uma nova abordagem sobre a definição de parâmetros cinéticos

Submetido à Journal of Food Science

Crescimento de *Myriangium* sp. em meio Sabouraud: uma nova abordagem sobre a definição de parâmetros cinéticos

ABRAÃO BRITO PEIXOTO, JOSÉ AÍLTON CONCEIÇÃO BISPO, ERNESTO ACOSTA MARTÍNEZ

4.1 Resumo

Leveduras são microrganismos bastante conhecidos por sua facilidade de cultivo e adaptação a condições de processo. Neste estudo, foi realizada a definição dos parâmetros cinéticos de crescimento de duas cepas de levedura *Myriangium* sp. (Y6511 e Y6512) em meio Sabouraud nas temperaturas de 26, 30 e 34 °C no tempo t variando de $t_0 = 0$ h, $t_f = 36$ h. As concentrações celulares máximas foram de 30,50 g/L (Y6511 a 34 °C) e 34,00 g/L (Y6512, 34 °C). As velocidades específicas de crescimento máximas calculadas para as cepas Y6511 e Y6512 foram respectivamente 0,30 e 0,28 h⁻¹ na condição de crescimento a 26 °C após 11,5 h de crescimento (para Y6511) e 9,5 h de crescimento (para Y6512). As produtividades máximas em biomassa foram de 2,75 e 2,63 g/L.h para as cepas Y6511 e Y6512, respectivamente, alcançadas na temperatura de 26 °C. Para a cepa Y6511, o incremento unitário da temperatura eleva a concentração celular a um valor máximo de 0,27 g/L.°C no tempo de processo de 9,55 h e temperatura de 29,5 °C. De modo análogo, para a cepa Y6512, o incremento unitário da temperatura eleva a concentração celular a um valor máximo de 0,45 g/L.°C no tempo de processo de 7,35 h e temperatura de 26,8 °C. Os parâmetros observados podem ser utilizados para a produção de massa celular, em batelada ou processo contínuo, enzimas e outros bioprodutos de interesse comercial.

4.2 Abstract

Yeasts are microorganisms known for their ease of cultivation and adaptation to process conditions. Growth kinetic parameters were calculated for two strains of *Myriangium* sp. (Y6511 and Y6512) in Sabouraud medium at temperatures of 26, 30 and 34 °C at time t varying from $t_0 = 0$ h to $t_f = 36$ h. Maximum cell concentrations were 30.50 g/L (Y6511 at 34°C) and 34.00 g/L (Y6512, 34 °C). The maximum specific growth rates calculated for strains Y6511 and Y6512 were respectively 0.30 and 0.28 h⁻¹ in the growth condition at 26 °C after 11.5 h of growth (for Y6511) and 9.5 h of growth (for Y6512). Maximum biomass yields of 2.75 and 2.63 g/L.h for strains Y6511 and Y6512, respectively, were reached at 26 °C. The influence of

temperature was also evaluated. For strain Y6511, the unit increase in temperature raises the cell concentration to a maximum value of 0.27 g/L.°C in the process time of 9.55 h and temperature of 29.5 °C. For strain Y6512, the unit increase in temperature raises the cell concentration to a maximum value of 0.45 g/L.°C after 7.35 h of process and temperature of 26.8 °C. These parameters can be used for the production of cell mass, in batch or continuous process, enzymes and other bioproducts of commercial interest.

4.3 Introdução

Leveduras são fungos unicelulares. Dentre as espécies conhecidas, a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais estudada, tanto laboratorial quanto industrialmente. É hábil em fermentar açúcares de cana-de açúcar, milho, trigo, cevada e arroz, seja para a produção de bebidas, seja na indústria de panificação, para expandir a massa. Ainda, esta espécie de microrganismo é apontada como o microrganismo eucariótico ideal para estudos biológicos, sob um portfólio amplo de aplicações (SHERMAN, 1997). A espécie teve o primeiro genoma eucariótico totalmente sequenciado, anotado e disponibilizado ao público (GOFFEAU, 1997). A sequência completa do genoma da levedura possibilitou o desenvolvimento de muitas novas ferramentas para analisar todos os componentes moleculares da célula e suas interações (SCHERENS & GOFFEAU, 2000). Agora, serve como um organismo modelo para compreender e interpretar a função das células eucarióticas como sequências de DNA humano (AGUILERA et al., 2022; MFAREJ, SKIBBEN, 2022; HE et al., 2022).

A divisão celular da levedura ocorre por brotamento. Os tamanhos das células haploide e diploide variam com a fase de crescimento e de cepa para cepa. A célula de levedura cresce em três fases principais - a fase latente, a fase exponencial e a fase estacionária. Na fase de latência, etapa inicial de crescimento, são bioquimicamente ativas e ocorre adaptação ao meio reacional sem aumento apreciável do número de células. Nesta fase, as células têm metabolismo ativo, cujas vias metabólicas principiam a formação de nutrientes essenciais com vistas ao crescimento exponencial. A duração desta fase depende da concentração do inóculo e das condições ambientais, tais como temperatura, pH, pO₂, concentração de sais, vitaminas, agitação etc. Com a aceleração do metabolismo celular, ocorre, concomitantemente, a replicação do DNA e posterior divisão celular, dando início à fase exponencial de crescimento. Nota-se, então, uma aceleração do crescimento celular onde a duplicação da sua concentração é considerada como sendo o tempo de geração, influenciado, por sua vez, pelas condições do próprio microrganismo, do meio de crescimento e da temperatura, dentre outros fatores. A fase

posterior do crescimento da levedura, fase estacionária, é caracterizada pela desaceleração do metabolismo e posterior redução da divisão celular. A alta densidade celular é o fator preponderante a evidenciar redução do metabolismo, sobretudo pela competição pelo substrato, escasso em fases avançadas de operações com batelada simples.

Portanto, o entendimento de como estas fases de crescimento se concatenam e de quanto tempo se necessita para a transição entre elas, sobretudo sob a influência da variação de temperatura, permite elaborar estratégias de fermentação que reduzam o tempo de processo e se extraia os insumos desejados em seus pontos ótimos de produtividade. Neste trabalho, foi estudado o crescimento da cepa de levedura *Myriangium* sp., ainda sem fontes científicas que projetem seu potencial. Por este motivo, entender como este microrganismo cresce em meio rico em glicose será o ponto de partida para entendimentos mais profundos em trabalhos vindouros.

4.4 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo modelar matematicamente o processo de crescimento de *Myriangium* sp. em meio Sabouraud em frascos agitados.

4.4.1 Objetivos específicos

1. Definir a temperatura ótima de crescimento
2. Calcular os parâmetros cinéticos de crescimento
3. Determinar os parâmetros do modelo matemático adotado para a modelagem do processo

4.5 Metodologia

4.5.1 Origem do Microrganismo

Dois exemplares do microrganismo *Myriangium* sp., coletado na região da Antártica, foram recebidos em papelotes diretamente do Banco de Células do Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Neste trabalho, as cepas da levedura *Myriangium* sp. foram designadas pelos códigos Y6511 e Y6512, sendo tratadas como exemplares distintos.

4.5.2 Preparo do inóculo

4.5.2.1 Ativação do Microrganismo

Os papelotes recebidos foram dispensados em tubos de ensaio contendo 1 mL de meio líquido Sabouraud e mantidos em estufa a 30 °C por 48 h.

4.5.2.2 Formação da cultura estoque

O microrganismo ativado no tubo de ensaio foi vertido em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido Sabouraud (glicose, 20,0 g/L; peptona, 10,0 g/L) e mantido sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 24 h. Após este tempo, alíquotas de 1 mL foram coletadas em tubos de Eppendorf e mantidas sob congelamento a -5 °C, sendo consideradas como inóculos preparados para a condução dos experimentos.

4.5.3 Protocolo de Crescimento e Amostragem

Volume de 1 mL do inóculo foi vertido em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio Sabouraud. O processo de crescimento transcorreu em câmaras de agitação a 150 rpm. As temperaturas avaliadas foram de 26, 30 e 34 °C. Amostras de 1 mL foram coletadas a cada 4 h de processo, desde o tempo 0 até 36 h. Diluições foram realizadas de acordo com a necessidade. Ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.4 Estudo cinético do crescimento da biomassa

A definição da massa celular obedeceu ao protocolo de comparação por densidade óptica a 600 nm (OD600), de acordo com JANKE et al. (1999), após validação da metodologia. As medições de absorbância a 600 nm foram feitas automaticamente em um espectrofotômetro Varian Cary 50 UV/Vis usando uma cubeta de quartzo com comprimento óptico de 1 cm. As leituras foram conduzidas à temperatura ambiente. A zeragem do aparelho (branco) foi realizada com água destilada.

Em relação à biomassa, foi calculado o rendimento relativo à conversão de substrato em massa celular (Y_{XS}) por meio da Eq. 4.1.

$$Y_{XS} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde X e S correspondem à concentração (g/L) de biomassa e açúcares totais, respectivamente. Os índices 0 e f correspondem à concentração das variáveis no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e no tempo final ($t_f = 36$ h).

A produtividade volumétrica de biomassa (R_x) foi calculada por meio da Eq. 4.2

$$R_x = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde X_0 é a concentração de biomassa no tempo inicial ($t_0 = 0$ h) e X_t é a concentração no tempo t .

A taxa experimental global de consumo do substrato (q_s , $\text{g}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{h}$) foi calculada por meio da Eq. 4.3

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{XS}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Onde μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1}), calculada após a determinação da produtividade em biomassa por meio do modelo matemático adotado para o ajuste matemático do processo.

4.5.4.1 Modelagem Matemática e Avaliação Estatística dos Dados

Na presente investigação, os dados experimentais foram propostos para serem ajustados usando a seguinte função de ajuste (Eq. 4.4), inspirada na Equação de Boltzmann e demonstrada em estudos por BISPO et al. (2011), BISPO et al. (2013) e AMORIM et al. (2018).

$$f(x) = \frac{a_2 - a_1}{1 + \exp\left(\frac{x - a_3}{a_4}\right)} + a_2 \quad (\text{Eq. 4.4})$$

Em que x é a variável independente teórica e a_1 , a_2 , a_3 e a_4 são as constantes a serem determinadas.

O tratamento estatístico dos dados, obtidos em triplicata, foi realizado com uso do Software Matlab 2014a para o cálculo do coeficiente de determinação (R^2), quadrado médio do resíduo (RMSE), qui-quadrado (χ^2), desvio padrão (Std) e variância (Var). Os demais dados estatísticos, calculados para a Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey, foram extraídos pelo Software Microsoft Excel 2010. A significância $p \leq 0,05$ foi adotada para todos os casos.

4.6 Resultados e Discussões

Foi constatado em todos os experimentos, a redução da concentração de sólidos solúveis de 20 g/L, no início do processo, para 2,0 g/L ao final de 36 h de crescimento, descrevendo uma taxa de redução de açúcares de 90 % (18 g/L).

O comportamento cinético global do crescimento da biomassa por *Myriangium* sp. (Y6511 e Y6512) em meio Sabouraud foi calculado para cada condição de processo, tal como se descreve por meio da Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Dados cinéticos relativos ao crescimento de *Myriangium* sp. em meio Sabouraud.

	<i>Myriangium</i> sp. 6511			<i>Myriangium</i> sp. 6512		
	26 °C	30 °C	34 °C	26 °C	30 °C	34 °C
X_0 (g/L)	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
X_f (g/L)	29,50	30,00	30,50	33,00	33,50	34,00
R_x (g/L.h) ¹	0,817	0,831	0,844	0,914	0,928	0,942
μ (h ⁻¹) ^{1,2}	0,1580	0,1584	0,1589	0,1611	0,1615	0,1619
Y_{XS} (g/g) ¹	0,336	0,342	0,347	0,376	0,382	0,387
q_s ¹	0,470	0,464	0,458	0,429	0,423	0,418

R_x : produtividade volumétrica de biomassa; X_0 : concentração de biomassa no tempo inicial ($t_0 = 0$ h); X_f : concentração de biomassa no tempo final ($t_f = 36$ h); μ : taxa específica de crescimento; Y_{XS} : rendimento relativo à conversão de substrato em massa celular; q_s : taxa experimental global de consumo do substrato.

¹parâmetro médio calculado para a condição global de processo, considerando os pontos inicial e final entre os tempos $t_0 = 0$ h e $t_f = 36$ h.

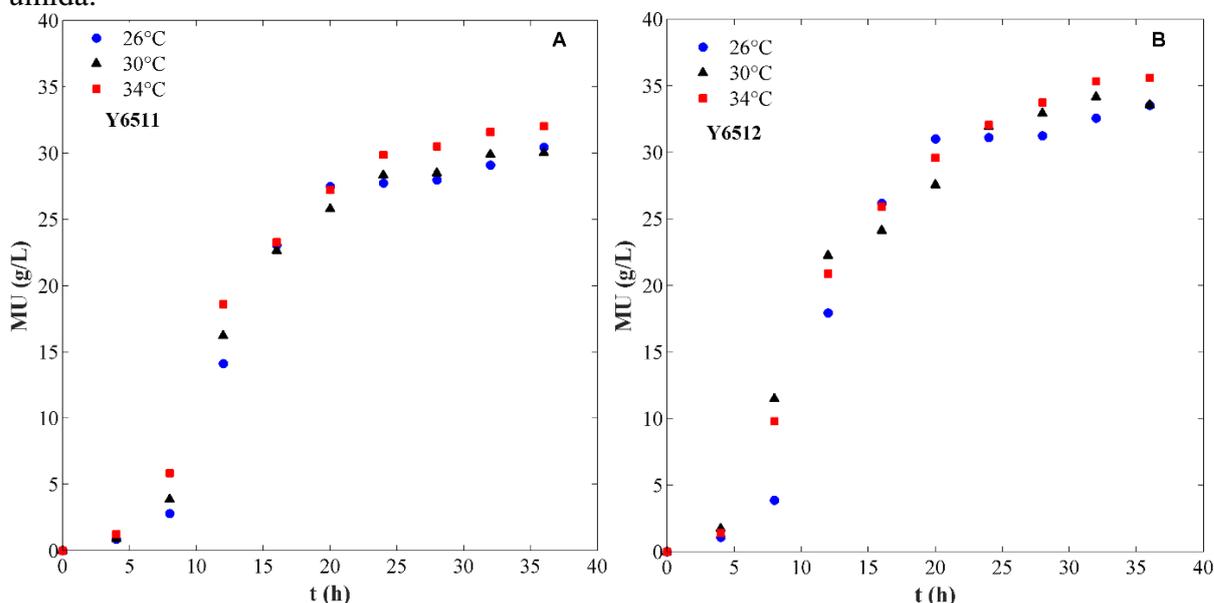
²cálculo realizado após conversão dos valores de massa úmida (MU) em massa seca (MS) por meio do fator de conversão ($c_f = 0,2056$), sendo $MS = c_f \cdot MU$.

Dados de velocidade específica de crescimento (μ) e rendimento (Y_{XS}) apresentados na Tabela 4.1 têm valores superiores àqueles apresentados por RAHMAN et al. (2021) (0,139 h⁻¹ e 0,194 g/g respectivamente) e similares a valores apresentados por NIETO-SARABIA et al. (2022) 0,132 h⁻¹ e 0,4260 g/g em trabalhos com outros microrganismos.

Na avaliação do crescimento dos microrganismos, descreve-se uma curva típica do crescimento de leveduras, tal como demonstrado por NIETO-SARABIA et al. (2022) em trabalho realizado com *Pichia kudriavzevii* ou por MAHMOOD et al. (2021) com *Saccharomyces cerevisiae*. As fases de crescimento ficam evidentes no comportamento gráfico, quais sejam: fase de adaptação (LAG), fase de crescimento exponencial (LOG), fase estacionária.

A evolução da massa celular úmida (MU), plotada em gráfico em função do tempo de crescimento, pode ser observada por meio da Figura 4.1.

Figura 4.1 – Dados experimentais do crescimento da levedura *Myriangium* sp. (A: Y6511 e B: Y6512) em meio Sabouraud nas temperaturas de 26 °C (●), 30 °C (▲) e 34 °C (■). MU: massa úmida.



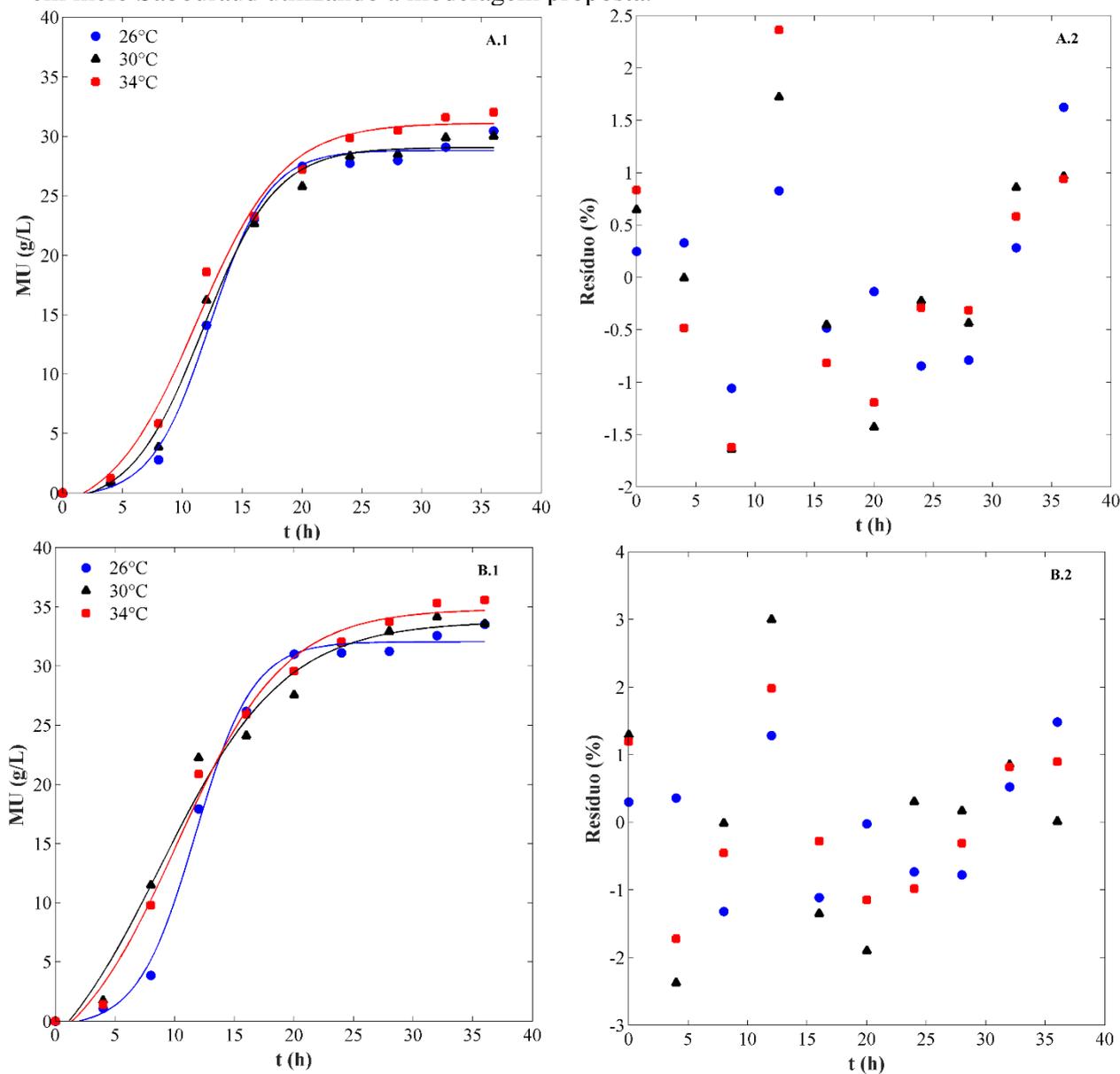
Notam-se as fases iniciais de adaptação de ambas as cepas (Y6511 e Y6512) com períodos curtos. Para o exemplar Y6511, a fase LAG teve duração aproximada de 8 h, quando submetida ao crescimento em todas as temperaturas testadas. Para o exemplar Y6512, os dados demonstram uma fase adaptativa maior para a condição de crescimento a 26 °C, com 8 h, enquanto para as temperaturas de 30 e 34 °C, o comportamento é similar, com fase de adaptação de aproximadamente 4 h. Em todos os casos demonstrados, a temperatura denota proporcionalidade direta com o crescimento das leveduras, nas fases de adaptação e exponencial. Observa-se ainda que a fase estacionária se inicia mais previamente, quanto menor é a temperatura de processo.

Com a utilização do modelo matemático para o ajuste dos dados experimentais, interpretações mais aprofundadas puderam ser arraigadas acerca das condições de processo e vias metabólicas possivelmente utilizadas para a propagação celular. Desse modo, foram confeccionadas as curvas relativas ao ajuste do modelo matemático aos dados experimentais (Figura 4.2) e, concomitantemente, o cálculo do resíduo, que denota a discrepância entre os dados experimentais e a resposta trazida pelo modelo matemático proposto.

Os fenômenos observados podem ser explicados pela adaptação celular ao crescimento em temperaturas medianas, em torno de 30 °C, usualmente praticada em condições laboratoriais para síntese de enzimas voltadas à produção de etanol de segunda geração (SIDANA et al., 2022), ou supressão nutricional das células para produção de taxano (WALLS et al., 2022). Esta faixa de temperatura também favorece a formação do complexo enzima-substrato, o que reduz

a energia de ativação das reações promotoras do crescimento celular (SHULER & KARGI, 2002). Por consequência, a multiplicação dos indivíduos se dá mais cedo. Da mesma forma, a fase exponencial inicia-se mais cedo. De modo antagônico, com a redução da energia de ativação das reações de crescimento em temperaturas de melhor adaptação, o esgotamento energético se dá mais tarde. Este fator denota uma extensão da fase exponencial e uma antecipação do início da fase estacionária.

Figura 4.2 - Ajuste do modelo matemático aos dados experimentais do crescimento da levedura *Myriangium* sp. (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e respectivos resíduos (A.2: Y6511; B.2: Y6512) em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta.



A modelagem matemática demonstra um ajuste que acompanha os dados experimentais, cujos resíduos, aproximadamente 2,4 e 3,0 para as amostras Y6511 e Y6512, respectivamente,

mitigam possíveis discrepâncias acerca de conclusões que se façam a partir de manipulações algébricas. Ainda, os dados experimentais podem ser explicados pelo modelo adotado com grau de confiabilidade superior a 98,0 % para todas as temperaturas e amostras testadas, tal como pode ser observado por meio da Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Dados estatísticos calculados por meio do software Matlab 2014a para a levedura *Myriangium* sp., cepas Y6511 e Y6512, submetida ao crescimento em meio Sabouraud nas temperaturas de 26 °C, 30 °C e 34 °C.

	<i>Myriangium</i> sp. Y6511			<i>Myriangium</i> sp. Y6512		
	26 °C	30 °C	34 °C	26 °C	30 °C	34 °C
R ²	0,9957	0,9927	0,9916	0,9952	0,9853	0,9928
RMSE	0,7930	1,0119	1,1240	0,9203	1,5038	1,1157
χ^2	1,0481	1,7064	2,1055	1,4117	3,7692	2,0747
Std	12,0441	11,8357	12,2620	13,2911	12,4130	13,1568
Var	145,0610	140,0840	150,3570	176,6520	154,0830	173,1010

R²: coeficiente de determinação; RMSE: erro médio quadrático da raiz; χ^2 : qui-quadrado; Std: desvio padrão; Var: variância; χ^2 tab (18 graus de liberdade a 5 % de significância) = 28,869.

O erro médio quadrático da raiz (RMSE) é outra forma de observar o quanto o modelo matemático adotado se ajusta aos dados experimentais. Neste caso, quanto menor o RMSE, melhor é o ajuste, ou seja, menor é o resíduo. Portanto, a definição da equação de ajuste para a concentração celular de *Myriangium* sp. Y6511 a 26 °C é a que melhor se ajusta aos pontos experimentais (RMSE = 0,7930 – Tabela 4.2).

De modo similar, o qui-quadrado calculado para todas as amostras testadas (Tabela 4.2) é menor que o qui-quadrado tabelado (28,869), o que denota não haver diferença estatisticamente significativa entre o dado experimental e o valor calculado pelo modelo matemático adotado.

Ao se considerar especificamente o modelo matemático adotado para o ajuste dos dados experimentais, os coeficientes da equação de ajuste foram calculados para todos os cenários testados na investigação do crescimento de *Myriangium* sp. (Tabela 4.3).

A avaliação estatística dos dados apresentados em triplicata por meio da ANOVA demonstram que, para as cepas Y6511 e Y6512 (Tabela 4.4), o valor de F calculado é superior ao F tabelado para todas as fontes de variação estudadas, considerando a significância de 5 %.

Tabela 4.3 - Coeficientes da equação de ajuste proposta para a modelagem matemática do crescimento de *Myriangium* sp., cepas Y6511 e Y6512, em meio Sabouraud nas temperaturas de 26 °C, 30 °C e 34 °C.

	<i>Myriangium</i> sp. Y6511			<i>Myriangium</i> sp. Y6512		
	26 °C	30 °C	34 °C	26 °C	30 °C	34 °C
a_1	-29,6925	-31,5556	-35,6571	-33,1673	-49,5822	-44,9025
a_2	-0,4383	-1,2450	-2,2709	-0,5549	-7,9006	-5,0366
a_3	12,3013	11,7641	11,2156	11,7364	8,7325	10,1587
a_4	-2,4450	-3,0114	-3,6171	-2,4162	-5,2317	-4,5404

Tabela 4.4 – ANOVA para os dados do crescimento da cepa *Myriangium* sp., cepas Y6511 e Y6512, em meio Sabouraud com significância de 5 %.

Amostra	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Y6511	Tempo	16277,22	9	1808,58	14558,11	1,07E-96	2,04
	Temperatura	78,71	2	39,36	316,80	1,29E-32	3,15
	Interações	59,24	18	3,29	26,49	5,49E-22	1,78
	Dentro	7,45	60	0,1242			
	Total	16422,6291	89				
Y6512	Tempo	14682,57	9	1631,40	19229,09	1,07E-96	2,04
	Temperatura	38,42	2	19,21	226,43	1,29E-32	3,15
	Interações	140,50	18	7,81	92,00	5,49E-22	1,78
	Dentro	5,09	60	0,0848			
	Total	14866,58	89				

Portanto, conclui-se que há pelo menos dois níveis de temperatura testadas em que o desempenho do crescimento celular é significativamente diferente.

O Teste de Tukey, aplicado para os dados de crescimento com significância de 5 % (Tabela 4.5), denota quais valores de concentração celular são estatisticamente diferentes dentro da faixa de temperatura estudada.

A distinção entre as concentrações celulares se inicia a partir de 8 h e 4 h para as cepas Y6511 e Y6512, respectivamente, e persiste, para, pelo menos, dois níveis de temperatura até o final do processo. Portanto, há diferença significativa para os valores de concentração celular dentro da faixa de temperatura estudada.

Tabela 4.5– Teste de Tukey aplicado às médias da concentração celular de *Myriangium* sp. (Y6511 e Y6512) em meio Sabouraud.

MU média (g/L) - Y6511										
T (°C)	t (h)									
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
26	0,00 ^a	0,24 ^a	1,73 ^a	12,32 ^a	23,08 ^{a,b}	29,19 ^a	29,55 ^a	29,92 ^a	31,55 ^a	33,57 ^a
30	0,00 ^a	0,28 ^a	2,58 ^b	14,67 ^b	22,55 ^a	26,80 ^b	26,80 ^b	30,67 ^b	32,74 ^b	32,94 ^a
34	0,00 ^a	0,54 ^a	4,24 ^c	17,44 ^c	23,37 ^b	28,82 ^a	32,73 ^c	33,64 ^c	35,34 ^c	36,01 ^b

MU média (g/L) – Y6512										
T (°C)	t (h)									
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36
26	0,00 ^a	1,23 ^a	4,02 ^a	18,05 ^a	26,16 ^a	30,86 ^a	30,97 ^a	31,09 ^a	32,38 ^a	33,32 ^a
30	0,00 ^a	1,88 ^b	11,65 ^b	22,31 ^b	24,14 ^b	27,49 ^b	31,77 ^b	32,72 ^b	33,90 ^b	33,35 ^a
34	0,00 ^a	1,55 ^{a,b}	9,97 ^c	20,95 ^c	25,91 ^a	29,48 ^c	31,87 ^b	33,52 ^c	35,04 ^c	35,30 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

De posse do modelo de ajuste com os coeficientes definidos, iniciam-se os contrastes entre os parâmetros de processo com vistas à confecção da superfície de resposta e das curvas de contorno, derivadas da concatenação paramétrica entre a massa úmida [MU(g/L)], o tempo de processo [t (h)] e a temperatura [T (°C)] (Figura 4.3).

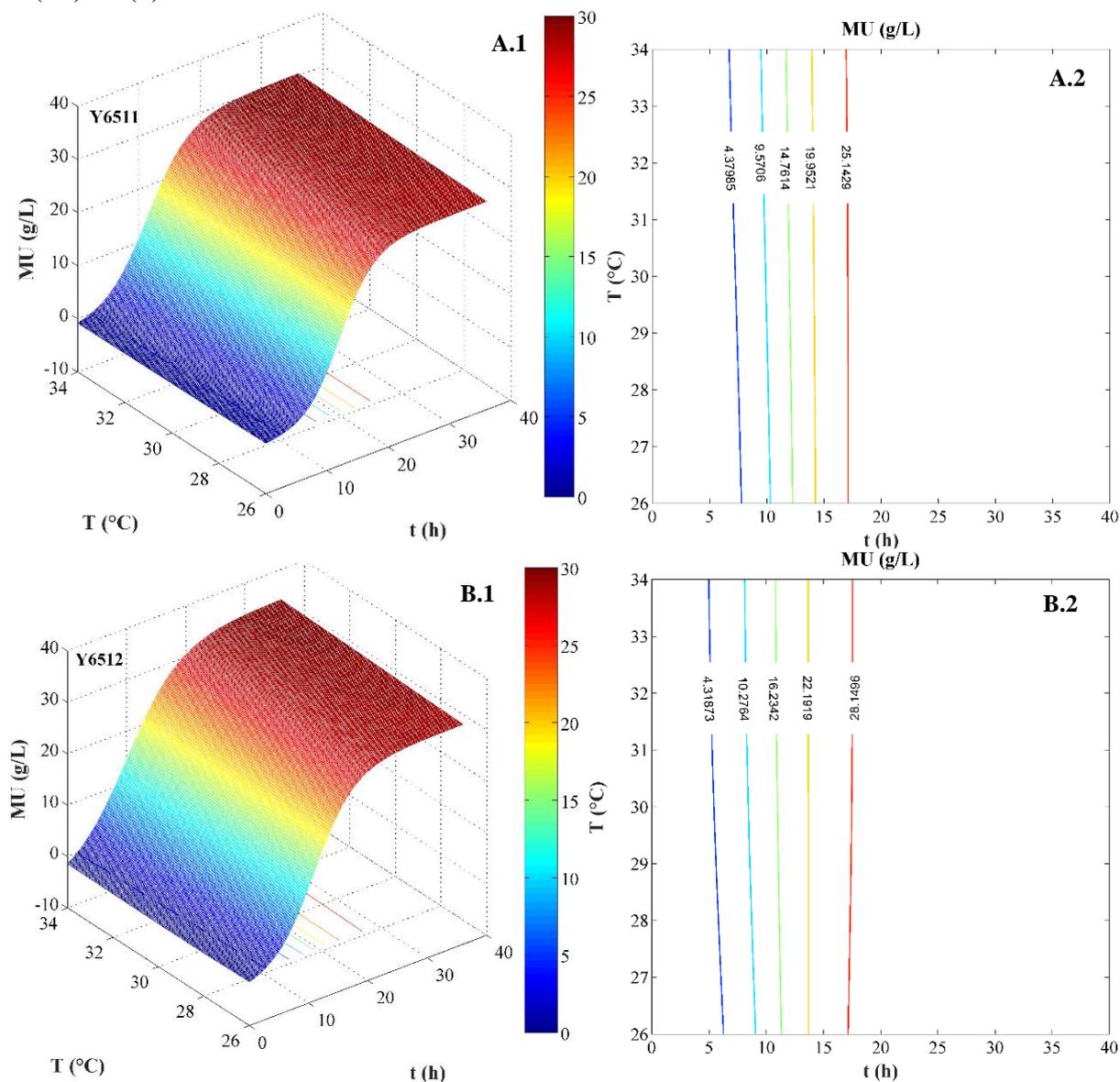
Esta ferramenta de avaliação do crescimento vai além da forma clássica de apresentação dos resultados, exibidas até aqui, e confere maior detalhamento do processo de crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud.

A associação entre os gráficos apresentados permite afirmar aquilo que foi apontado nos comentários acerca da Figura 4.1. Em observação às superfícies de resposta, os níveis limítrofes para a concentração das leveduras foi de aproximadamente 30 e 35 g/L para as cepas Y6511 e Y6512, respectivamente. Analogamente, o aumento da temperatura de processo influencia positivamente o crescimento, dentro da faixa estudada.

Para ambas as curvas de contorno, denotam-se condições de processo onde se observa mais claramente o final da fase de adaptação, em torno de 7,5 h, e final da fase exponencial, em torno de 17 h. A linearidade dos cortes apresentados para ambas as amostras, destacam as faixas de tempo com pequena variabilidade para toda a extensão dos valores de temperatura no intervalo estudado. Para se ratificar estas condições, percebe-se que, para a cepa de levedura *Myriangium* sp. Y6511, a concentração celular de 4,38 g/L é alcançada após aproximadamente 7 h de processo na temperatura de 34 °C, enquanto que, para a temperatura de 26 °C, este

mesmo valor de concentração celular é alcançado após aproximadamente 8 h de processo. Para a cepa de levedura *Myriangium* sp. Y6512, a concentração celular de 4,32 g/L é alcançada após aproximadamente 5 h de processo na temperatura de 34 °C, enquanto que, para a temperatura de 26 °C, este mesmo valor de concentração celular é alcançado após aproximadamente 6 h de processo. Esta observação permite inferir melhores condições de crescimento em temperaturas mais altas com vistas ao estreitamento da fase de adaptação.

Figura 4.3 - Superfície de resposta (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e curvas de contorno (A.2: Y6511; B.2: Y6512) construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Dados para a curva de contorno consideram o parâmetro MU (g/L) fixo para uma variação dos parâmetros T (°C) e t (h).



Para uma averiguação ainda mais detalhada acerca do crescimento das leveduras, outras curvas de contorno foram confeccionadas, fixando-se, além da massa celular, os parâmetros tempo [t (h)] e temperatura [T (°C)], tal como se observa na Figura 4.4.

Os comportamentos de crescimento de ambas as cepas denotam pequena distorção para a condição de fixação do parâmetro t (h) com variação de MU (g/L) e T (°C). Para a cepa Y6511, fixando-se o tempo de crescimento em 12 h, observa-se que, para uma temperatura de 26 °C, a concentração celular apresentou valor teórico de aproximadamente 14,0 g/L. Para a temperatura de 34 °C, este valor foi de aproximadamente 15,5 g/L.

Neste contexto, SHAIGANI et al., 2021, trabalharam com *R. glutinis*, *T. asahii*, *R. mucilaginosa*, *R. toruloides* e *C. oleaginosus* para a produção de lipídios e observaram concentrações celulares em torno de 15,0 g/L após 48 h de processo, quando crescidas em meio complexo.

Para a cepa Y6512, considerando-se as mesmas condições do binômio tempo/temperatura tem-se que, para a condição 12 h/26 °C, MU foi de aproximadamente 18,0 g/L. Para a condição 12 h/34 °C, MU foi de aproximadamente 18,5 g/L.

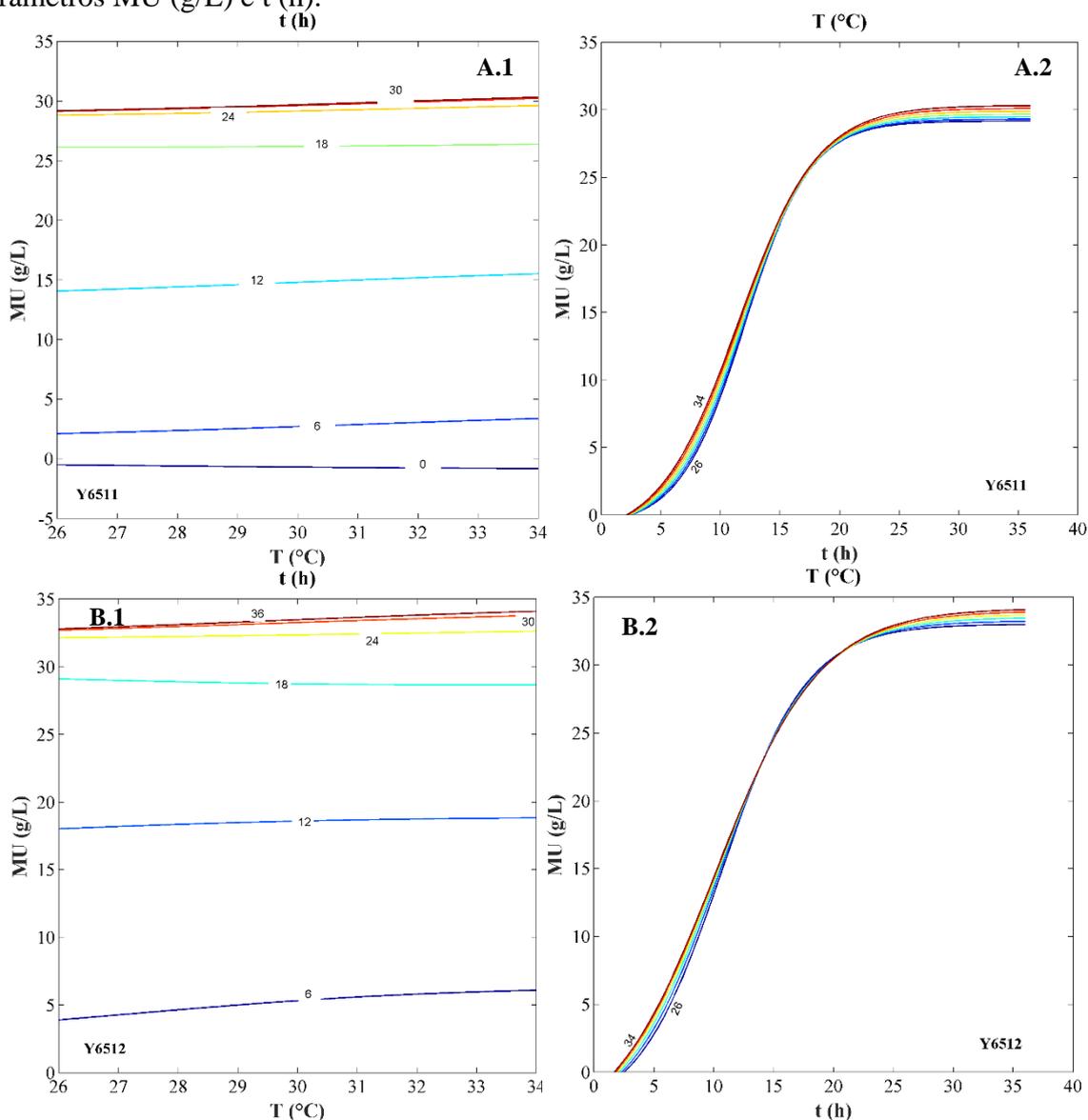
De modo análogo, as cepas estudadas apresentam valores de MU aproximadamente iguais a 29,0 e 30,5 g/L (para a cepa Y6511 com binômio 30 h/26 °C e 30 h/34 °C, respectivamente) e aproximadamente iguais a 33,0 e 34,0 g/L (para a cepa Y6512 com binômio 30 h/26 °C e 30 h/34 °C, respectivamente).

A termotolerância também foi alvo de estudo de pesquisadores, que trabalharam com leveduras estimuladas genotípica e fenotipicamente e apresentaram crescimento em temperaturas de até 42 °C (HUANG et al., 2018), 45 °C (AFRIN, 2021) ou 48 °C (NURCHOLIS et al., 2021).

Com a fixação do parâmetro T (°C) e variação de MU (g/L) e t (h), observa-se um estreitamento entre as curvas traçadas para toda a extensão de temperatura, de 26 °C a 34 °C. A avaliação do crescimento ratifica as considerações já apontadas nas figuras anteriores. Todavia, o descolamento das curvas após a fase exponencial evidencia que a fase estacionária se inicia com maior brevidade em valores inferiores de temperatura para ambas as cepas, dentro da faixa estudada. Neste contexto, estudos realizados por NONKLANG et al. (2008), demonstraram que cepas de *Kluyveromyces marxianus* apresentaram condição de crescimento

para temperaturas até 49 °C enquanto que cepas de *Saccharomyces cerevisiae* não cresceram em temperaturas a partir de 40 °C.

Figura 4.4 - Curvas de contorno construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Em A.1 (Y6511) e A.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro t (h) fixo para uma variação dos parâmetros MU (g/L) e T (°C). Em B.1 (Y6511) e B.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro T (°C) fixo para uma variação dos parâmetros MU (g/L) e t (h).



Em continuidade ao estudo do crescimento, o cálculo da produtividade pôde ser realizado para toda a extensão paramétrica estudada, uma vez que a equação de ajuste teve seus parâmetros definidos e sua derivada obtida.

A partir da derivação da equação de ajuste, obtiveram-se as produtividades em células para cepas estudadas e, por consequência, a possibilidade da confecção das superfícies de resposta e curvas de contorno (Figura 4.5) a partir das quais, discussões mais aprofundadas puderam ser tomadas.

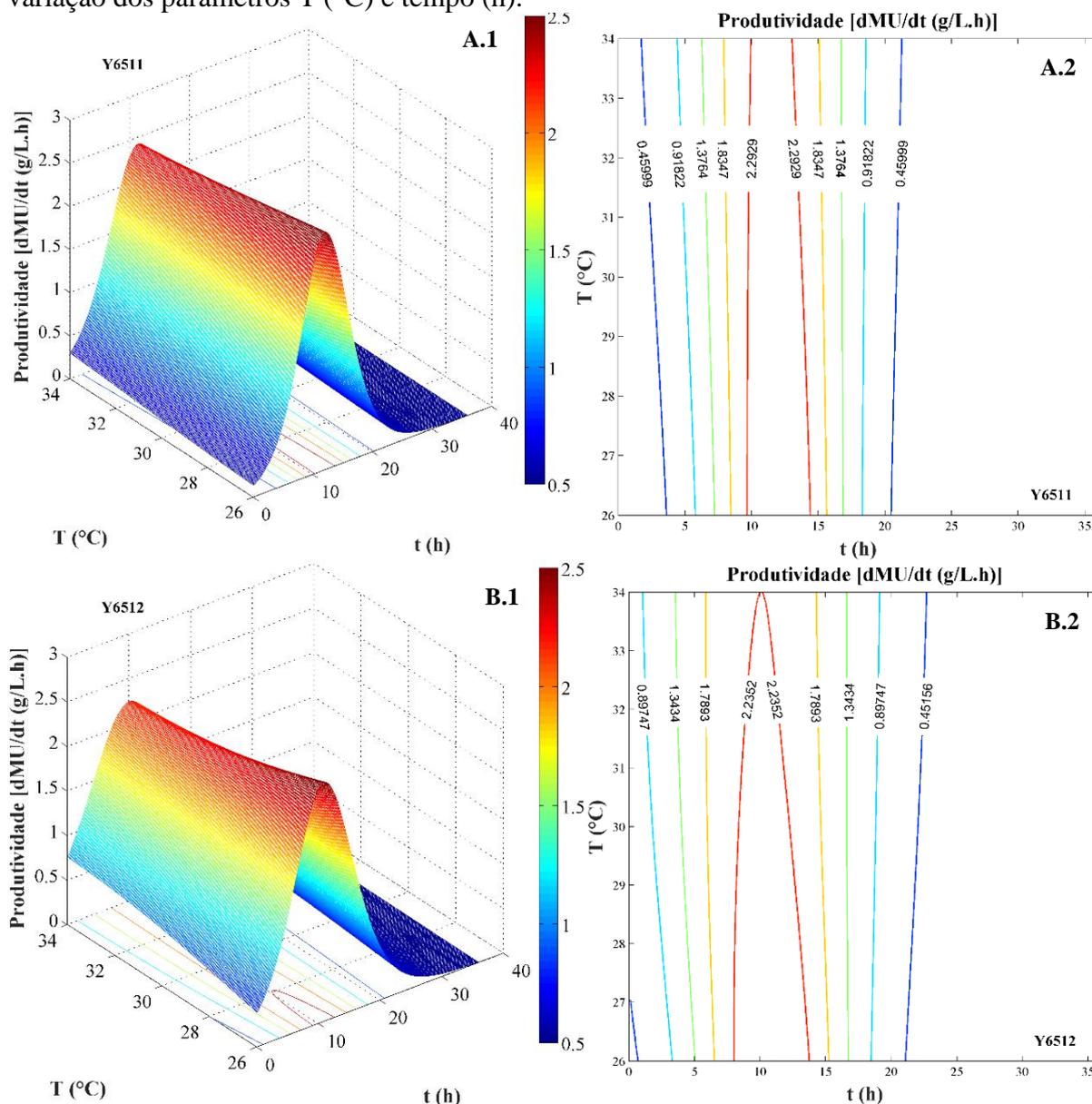
As superfícies de resposta para a produtividade exibem destacadamente uma região de inflexão superficial onde acontece o pico de produtividade, a partir do qual se inicia a fase estacionária. Neste cenário, pode-se destacar com mais evidências que, após 15 h de processo, a produtividade já se encontra em declínio e a fase estacionária já foi iniciada. Esta afirmação é ainda mais evidente quando se comparam as curvas de contorno. As afirmações podem ser aplicadas a ambas as cepas estudadas. Ainda sobre a produtividade, pode-se observar por meio das curvas de contorno que a cepa Y6511 alcança maior produtividade (2,29 g/L.h) em torno de 10 h de processo com declínio após 14,5 h. A cepa Y6512 alcança a maior produtividade (2,24 g/L.h) em torno de 8 h de processo com declínio após 14 h.

Outro fator relevante que merece destaque é que a produtividade máxima é alcançada mais cedo para ambas as cepas quando se executa o processo em temperaturas mais baixas. Essa condição ratifica uma antecipação do início da fase estacionária para a temperatura de 26 °C em relação ao processo à temperatura de 34 °C para ambas as cepas testadas.

Em adição aos dados apresentados para a produtividade, apresentamos ainda a possibilidade de cálculo da velocidade específica de crescimento, dada pela relação entre a produtividade e a concentração celular. Neste contexto, as velocidades específicas de crescimento máximas calculadas para as cepas Y6511 e Y6512 foram respectivamente 0,30 e 0,28 h⁻¹ na condição de crescimento a 26 °C após 11,5 h de crescimento (para Y6511) e 9,5 h de crescimento (para Y6512). Esses valores de taxa de crescimento são inferiores aos apresentados por MASI et al. (2021) (1,35 h⁻¹) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* a 32 °C para produção de etanol medicinal em condições otimizadas.

A temperatura de 26 °C favorece o aumento da produtividade. Por consequência, o alcance da concentração celular máxima se dá mais cedo, mas num valor abaixo daquele alcançado quando o processo se desenvolve a 34 °C. Este fenômeno acontece porque o aumento da concentração celular é inversamente proporcional à velocidade de crescimento.

Figura 4.5 - Superfície de resposta (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e curvas de contorno (A.2: Y6511; B.2: Y6512) construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Dados para a curva de contorno consideram o parâmetro Produtividade [dMU/dt (g/L.h)] fixo para uma variação dos parâmetros T (°C) e tempo (h).

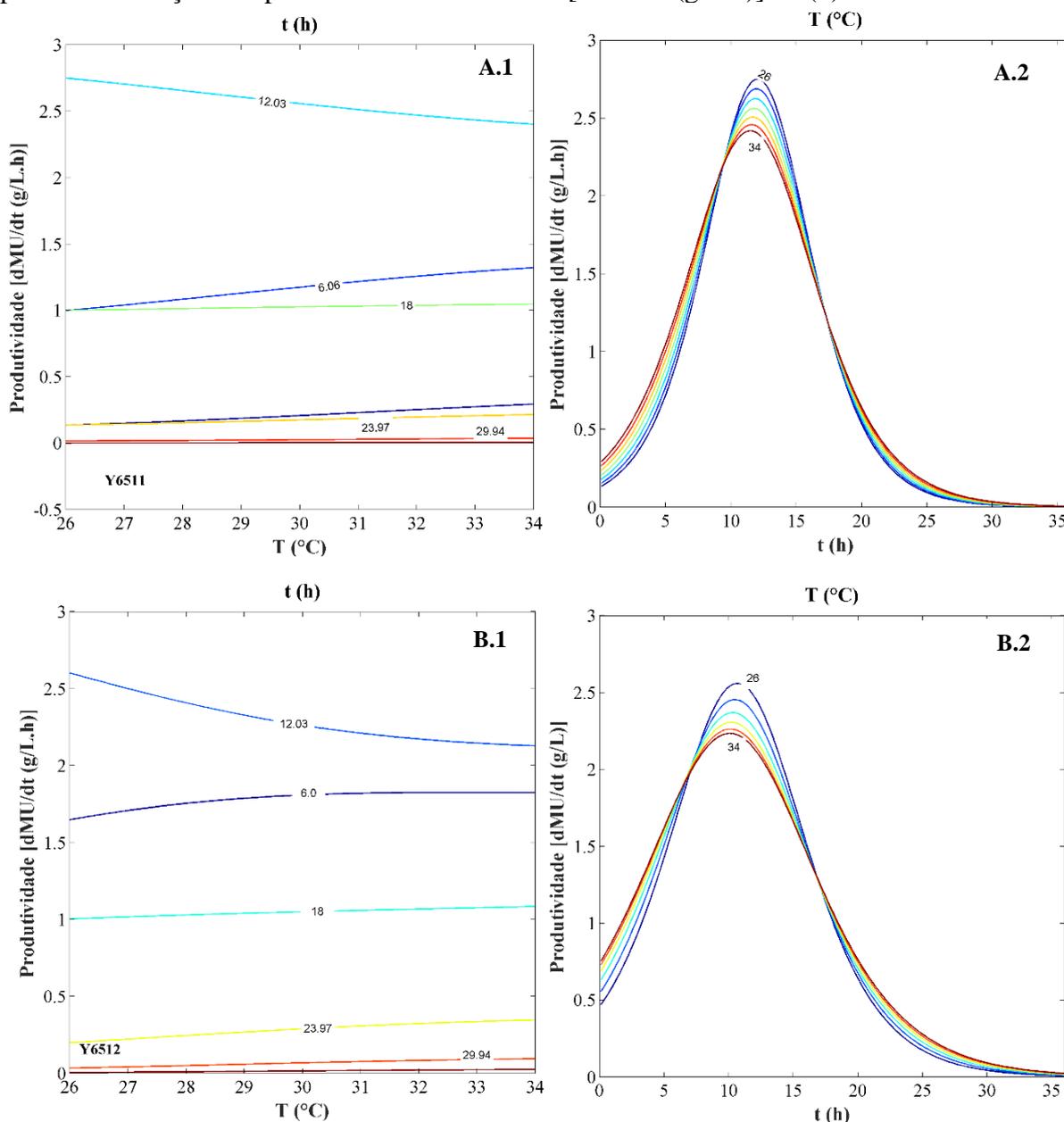


Acerca da análise de produtividade, curvas de contorno foram confeccionadas comparando-se este parâmetro à temperatura e ao tempo de crescimento microbiano, tal como se apresenta na Figura 4.6.

A análise dos gráficos da Figura 4.6 (A.1 e B.1) corroboram com os dados apresentados para a velocidade de crescimento microbiano na condição de maior produtividade, sendo notadas as produtividades máximas de 2,75 e 2,63 g/L.h para as cepas Y6511 e Y6512, respectivamente.

Na Figura 4.6 A.2 e na Figura 4.6 B.2, notam-se mais claramente os aumentos da produtividade, inversamente proporcionais ao aumento da temperatura. Neste gráfico, também se nota um comportamento assintótico da curva, tendendo à produtividade igual a zero. Essa condição reforça a contextualização de que a fase estacionária foi alcançada para todas as condições testadas.

Figura 4.6 - Curvas de contorno construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Em A.1 (Y6511) e B.1 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro t (h) fixo para uma variação dos parâmetros Produtividade [dMU/dt (g/L.h)] e T (°C). Em A.2 (Y6511) e B.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro T (°C) fixo para uma variação dos parâmetros Produtividade [dMU/dt (g/L.h)] e t (h).



Na Figura 4.7 identificam-se regiões limítrofes onde a temperatura influencia na variação da concentração celular. Para a cepa Y6511, em torno das 10 h de processo, a concentração celular é aumentada de 0,21 g/L.°C para um incremento unitário da temperatura. Esse aumento pode ser alcançado em praticamente toda a faixa de temperatura estudada.

Outra forma de analisar o processo aqui reportado é avaliar como o incremento de temperatura influencia na variação da concentração celular. Dessa forma, a equação de ajuste foi derivada em relação à temperatura, resultando nas superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 4.7.

Para a cepa Y6512, entre os tempos de 6 e 10 h de processo, o incremento unitário da temperatura provoca um aumento de 0,34 g/L.°C na concentração celular entre as temperaturas de 26 e 29 °C. Nota-se ainda que a influência da temperatura sobre o crescimento celular perde intensidade após 15 h de processo, reforçando a existência de uma fronteira temporal a partir da qual as leveduras entram em fase estacionária. Ainda acerca da influência da temperatura sobre o crescimento celular, cortes gráficos do parâmetro dMU/dT (g/L.°C) foram relacionados a t (h) e T (°C), assim como se nota na Figura 4.8.

Para a cepa Y6511, considerando-se cortes adjacentes aos demonstrados graficamente, o incremento unitário da temperatura eleva a concentração celular a um valor máximo de 0,27 g/L.°C no tempo de processo de 9,55 h e temperatura de 29,5 °C. De modo análogo, para a cepa Y6512, o incremento unitário da temperatura eleva a concentração celular a um valor máximo de 0,45 g/L.°C no tempo de processo de 7,35 h e temperatura de 26,8 °C.

Figura 4.7 - Superfície de resposta (A.1: Y6511; B.1: Y6512) e curvas de contorno (A.2: Y6511; B.2: Y6512) construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Dados para a curva de contorno consideram o parâmetro dMU/dT (g/L.°C) fixo para uma variação dos parâmetros T (°C) e t (h). Considerando dMU/dT (g/L.°C) como a taxa de variação da concentração celular, dependente da temperatura do processo.

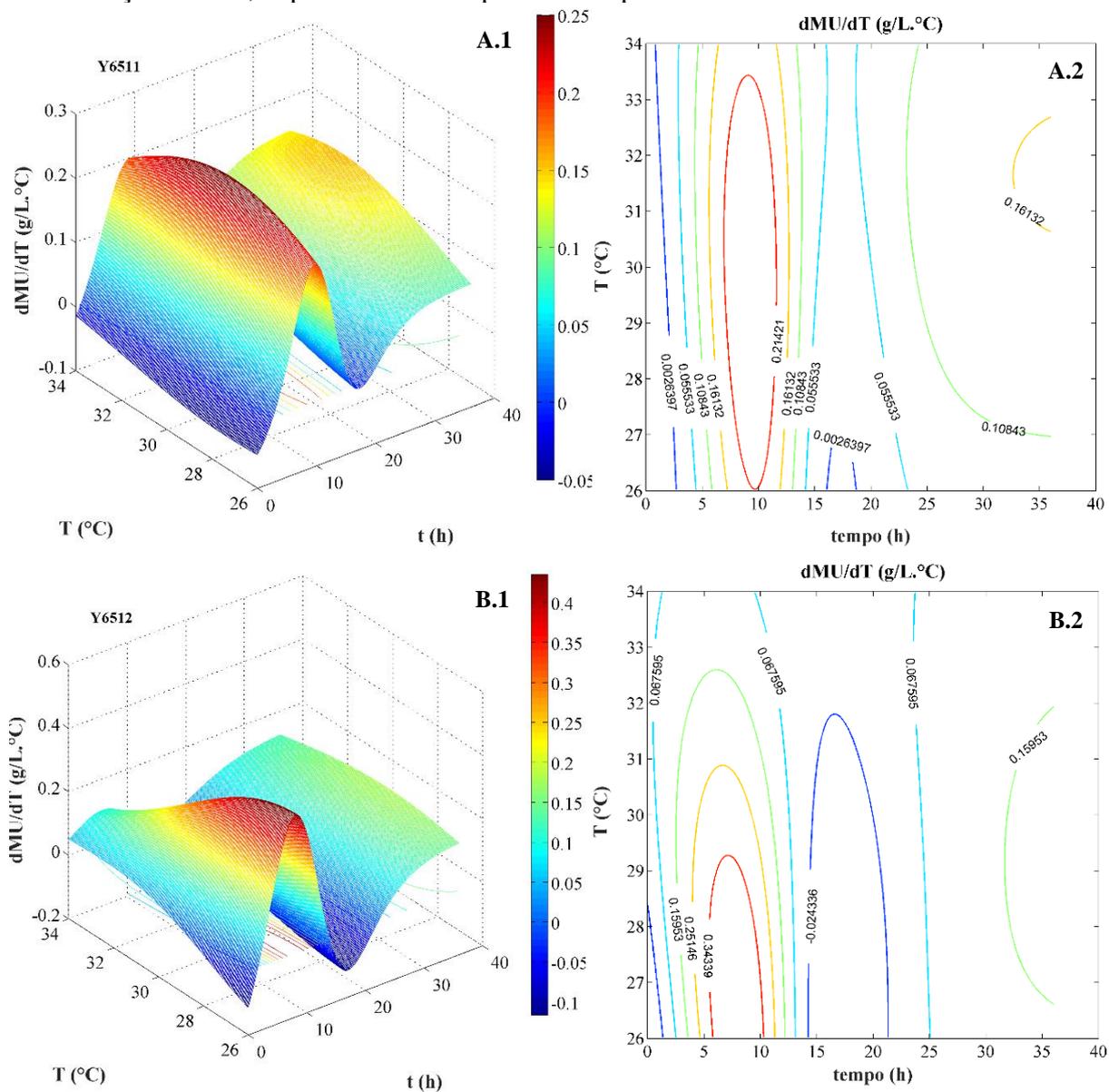
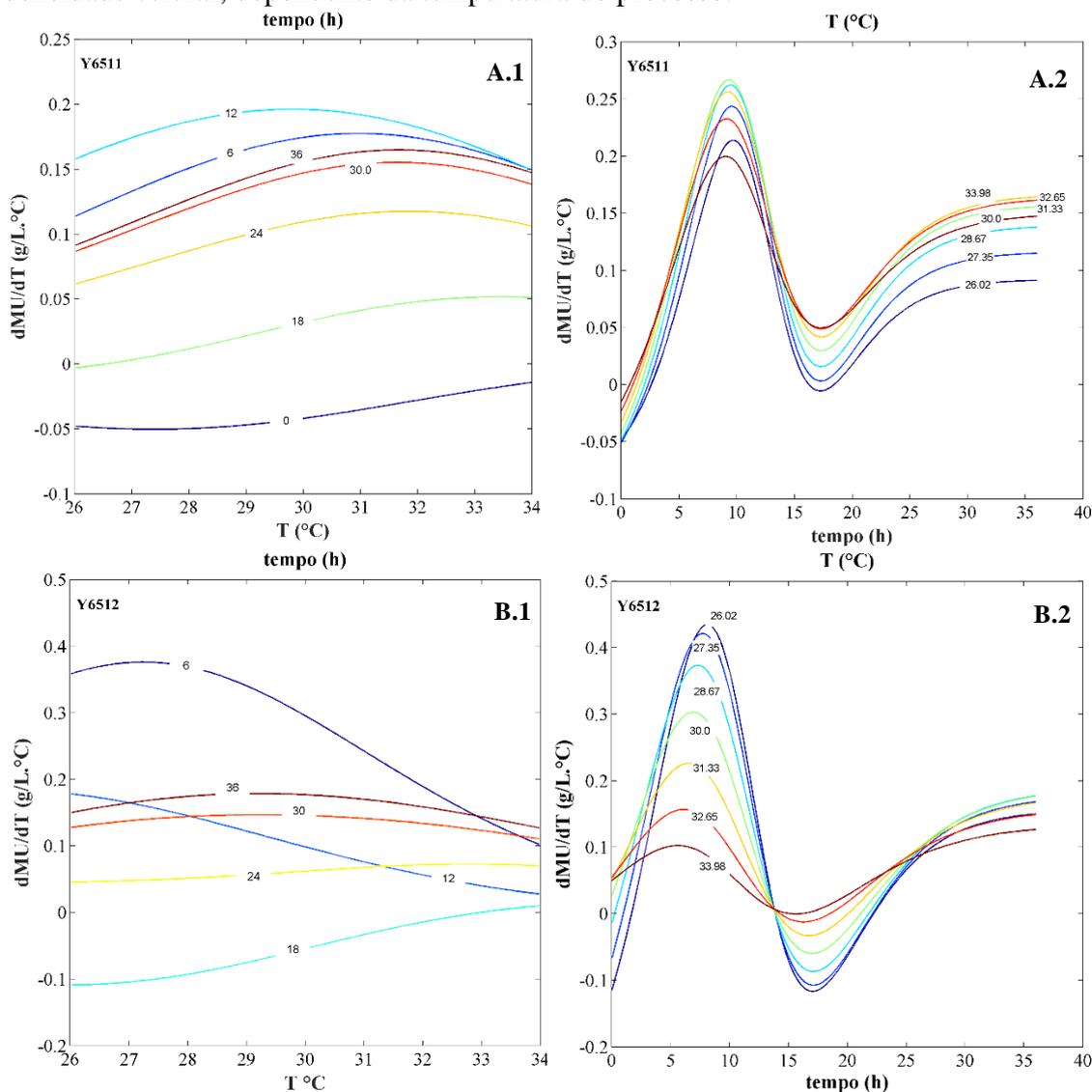


Figura 4.8 - Curvas de contorno construídas a partir do ajuste dos dados experimentais para o crescimento da levedura *Myriangium* sp. em meio Sabouraud utilizando a modelagem proposta. Em A.1 (Y6511) e B.1 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro t (h) fixo para uma variação dos parâmetros dMU/dT (g/L.°C) e T (°C). A.2 (Y6511) e B.2 (Y6512): dados para a curva de contorno consideram o parâmetro T (°C) fixo para uma variação dos parâmetros dMU/dT (g/L.°C) e t (h). Considerando dMU/dT (g/L.°C) como a taxa de variação da densidade celular, dependente da temperatura do processo.



4.7 Conclusões

A literatura científica não dispõe de acervo com estudos sobre o comportamento da cepa de levedura *Myriangium* sp., motivo pelo qual este trabalho se torna o início do entendimento sobre o comportamento deste microrganismo. A cepa de levedura *Myriangium* sp. apresenta grande potencial de crescimento em meio Sabouraud, cujos parâmetros de processo considerados ótimos podem ser entendidos como sendo dependentes dos objetivos do processo. Caso o objetivo seja o alcance de concentração máxima de células em batelada, a temperatura

adotada deve ser de 34 °C, onde as concentrações de 29,70 e 33,37 g/L são alcançadas em 36 h de processo para as cepas Y6511 e Y6512 respectivamente. Todavia, para operações com batelada alimentada, onde se deve manter as condições de maior velocidade de crescimento e produtividade, considerando a influência da temperatura, as condições de alimentação devem ser adotadas da seguinte forma: i) para a cepa Y6511, alimentação iniciada no tempo 9,55 h à temperatura de 29,5 °C; ii) para a cepa Y6512, alimentação iniciada no tempo 7,35 h à temperatura de 26,8 °C. O mesmo pode ser adotado para processo contínuo de crescimento. Avaliações de atividade enzimática, usualmente estudadas nas regiões onde se inicia a fase estacionária, devem ser tomadas em torno de 15 h para ambas as cepas.

4.8 Referências

AFRIN, S.; PROMEE, J. S.; NAHID, M.; SATTER, M. A.; HAQUE, M. A.; SARKER, A. K.; BHUIYAN, M. N. I. Influence of thermal and osmotic pressure on the growth and viability of *Candida shehatae* var *shehatae*. **Journal of Yeast and Fungal Research**, 12(2), (2021), 20-27. <https://doi.org/10.5897/JYFR2020.0201>

AGUILERA, P., DUBARRY, M., HARDY, J., LISBY, M., SIMON, M-N, GÉLI, V. Telomeric C-circles localize at nuclear pore complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, 2022. doi.org/10.15252/emboj.2021108736

AMORIM, T., S.; LOPES, S. B.; BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; CARVALHO, G. B. M.; MARTÍNEZ, E. A. Influence of acerola pulp concentration on mead production by *Saccharomyces cerevisiae* AWRI 796. **LWT - Food Science and Technology**, 97 (2018) 561–569

BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; SOUZA, V. B.; SILVA, J. B. A.; CARVALHO, G. B. M. Extending the kinetic solution of the classic Michaelis–Menten model of enzyme action. **J Math Chem**, v. 49, p. 1976–1995, 2011

BISPO, J. A. C.; BONAFE, C. F. S.; KOBLITZ, M. G. B.; SILVA, C. G. S.; SOUZA, A., RABELO. Substrate and enzyme concentration dependence of the Henri Michaelis Menten model probed by numerical simulation. **Journal of Mathematical Chemistry**, v. 51, p. 144-152, 2013

BOTSTEIN, D.; CHERVITZ, S. A.; CHERRY, J. M. Yeast as a model organism, **Science** (1997) 277(5330): 1259–1260.

CHUKWUDI, I. Nnamchi, et al. Studies on Bioethanol Production with Thermo Tolerant Yeast Isolates and their Co-Cultures using African Wild Cocoyam as Feedstock. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, 7(4): 1-10, 2021

GOFFEAU, A. The yeast genome directory, **Nature** 387 (Suppl.): 5–6 (1997).

HE, B., FU, Z., WU, Y., ZHAO, G. Research progress of mammalian synthetic genomics. [J]. **Synthetic Biology Journal**, 2022. doi: 10.12211/2096-8280.2021-006.

JANKE, S. A.; FORTNAGEL, P.; BERGMANN, R. Microbiological turbidimetry using standard photometers. **BIOspektrum**, 1999; Vol. 6: 501-502.

MAHMOOD, S.; ALI, A.; DARWESH, A.; ZAM, W. Optimization of baker's yeast production on grape juice using response surface methodology. **Acta Periodica Technologica** Issue 52, Pages: 89-110. 2021. <https://doi.org/10.2298/APT2152089S>

MFAREJ, M. G. AND SKIBBENS, R. V. Genetically induced redox stress occurs in a yeast model for Roberts syndrome. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, V 12, Issue 2, 2022, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab426>

MIENDA, B. S.; SHAMSIR, M. S. Thermotolerant micro-organisms in consolidated bioprocessing for ethanol production: a review. **Res Biotechnol.** 4(4):1–6. 2013

NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M.; AKADA, R. High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology** Vol. 74, No. 24, 2008, p. 7514-7521. <https://doi.org/10.1128/AEM.01854-08>

NIETO-SARABIA, V. L., BALLINAS-CESATTI, C. B., MELGAR-LALANNE, G., CRISTIANI-URBINA, E., MORALES-BARRERA, L. Isolation, identification, and kinetic

and thermodynamic characterization of a *Pichia kudriavzevii* yeast strain capable of fermentation. **Food and Bioproducts Processing**, (2022) 131, 109-124.

NURCHOLIS, M.; SETIAWAN, A.; KUSNADI, J.; MALIGAN, J. M. Isolation of thermo-tolerant and ethanol-tolerant yeast from local fermented foods and their potential as bioethanol producers. **Conf. Series: Earth and Environmental Science**, 924 (2021). doi:10.1088/1755-1315/924/1/012077

RAHMAN, K. H. A.; ISMAIL, K. S. K.; NAJIMUDIN, N. Growth of thermotolerant *Pichia kudriavzevii* UniMAP 3-1 strain for ethanol production using xylose and glucose at different fermentation temperatures. **Conf. Series: Earth and Environmental Science**, 765 (2021). doi:10.1088/1755-1315/765/1/012107

SHAIGANI, P.; AWAD, D.; REDAI, V.; FUCHS, M.; HAACK, M.; MEHLMER, N.; BRUECK, T. Oleaginous yeasts-substrate preference and lipid productivity: a view on the performance of microbial lipid producers. **Microb Cell Fact** 20, 220 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01710-3>

SCHERENS, B.; GOFFEAU, A. The uses of genome-wide yeast mutant collections, **Genome Biology** (2000) 229: 1–8

SHERMAN, F. Yeast genetics, *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine* 6: 302–325, (1997), edited by R. A. Meyers.

SHULER, M. L. & KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. **Prentice Hall**, 2nd ed. 553 p. 2002.

Capítulo 5 - Considerações Finais

Os resultados apresentados neste trabalho colaboram com o entendimento de como os microrganismos podem ter seus comportamentos modelados matematicamente para dar entendimento de como se obter melhores condições de crescimento celular com vistas à produção de insumos de interesse industrial. A busca pelas melhores condições de processo, seja para a obtenção de biomassa, seja para enzimas ou etanol, foi o alvo mais amplo de todo o estudo apresentado. Esta pretensão visou estabelecer parâmetros ótimos onde a produção de um determinado insumo pode ser obtida em condições de menor gasto energético, menor tempo de produção do insumo numa concentração desejada, maior capacidade de hidrólise ou maior concentração de biomassa.

Os dados demonstrados e modelados matematicamente por meio da equação de ajuste inspirada na equação de transferência de Boltzmann e as estratégias utilizadas não esgotam o campo de estudo para se obter condições de processo ainda melhores, sobretudo por meio de equipamentos cada vez mais precisos, cujos níveis de detalhamento genético, por exemplo, podem evidenciar necessidades microbiológicas nutricionais específicas, principalmente para a cepa de levedura *Myriangium* sp., cujo potencial está apenas sendo iniciado perante a comunidade científica.

Enfim, o legado deste trabalho é o início da formação de uma linha de pesquisa alicerçada na precisão da modelagem matemática para o entendimento cada vez mais profundo de como os microrganismos se comportam quando submetidos às variações dos parâmetros de processo.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

1. Otimizar a produção de amilases em meios submersos por *Myriangium* sp.
2. Estudar a capacidade de produção de insumos de interesse industrial em fermentadores automatizados
3. Investigar a capacidade de produção de celulases por *Myriangium* sp. tanto em meios submersos quanto em meio sólido.
4. Executar processos de produção de enzimas e etanol por meio de associação de culturas de leveduras.

Apêndice

Figura 0.1 - Resultados para o cálculo dos parâmetros ϕ_1 a ϕ_{10} do modelo obtido, representadas as bateladas 1, 2 e 3 para a produção das amilases

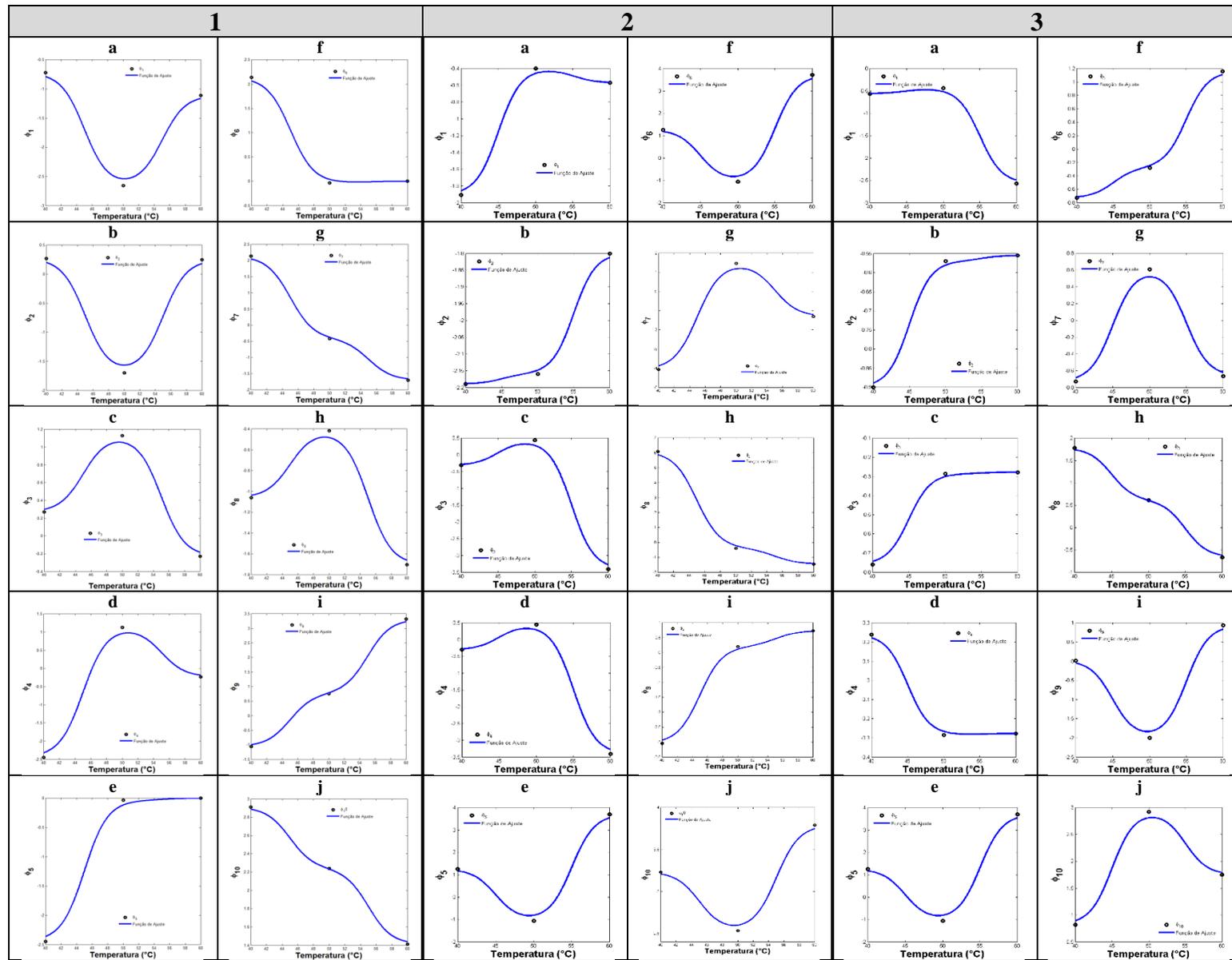
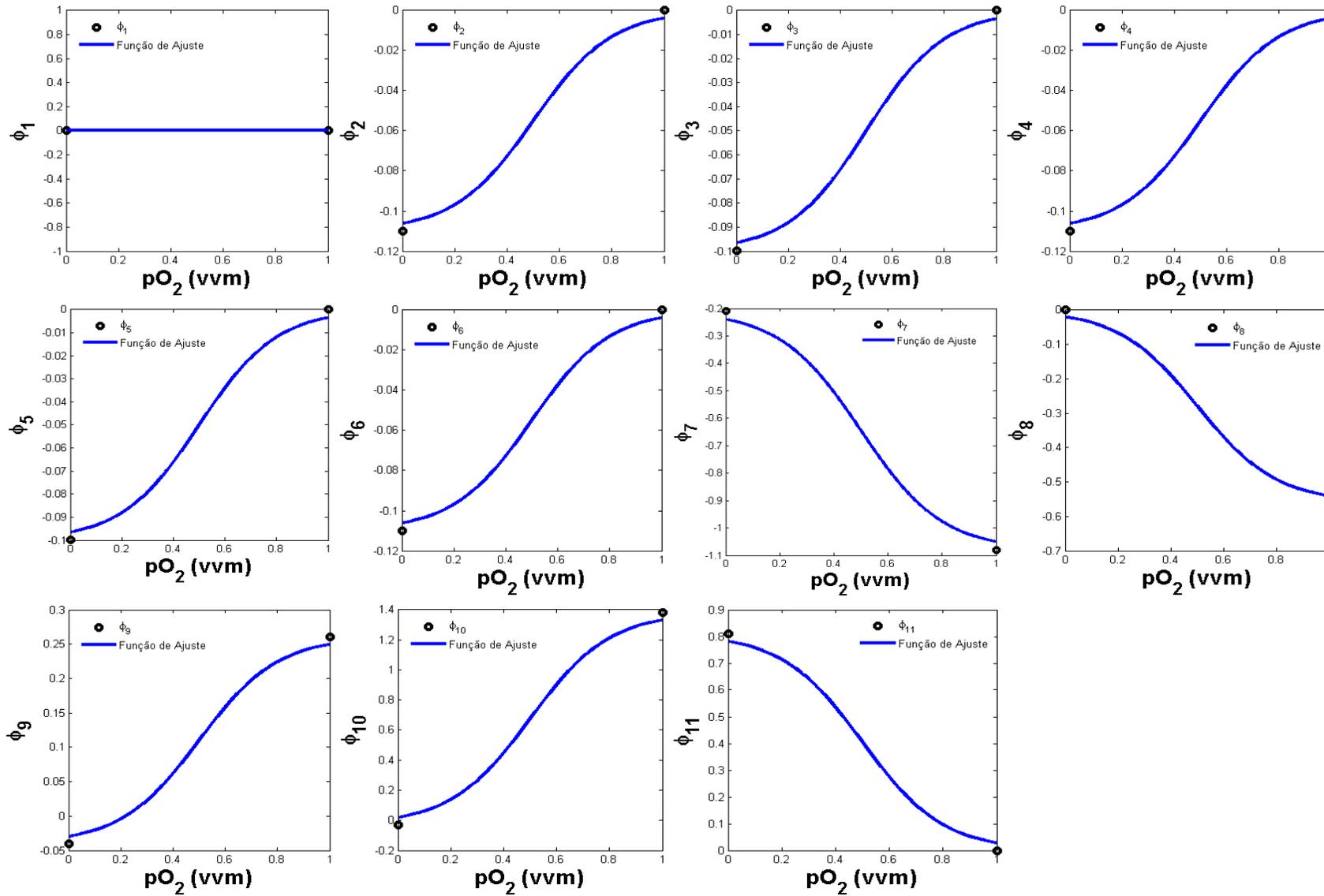


Figura 0.2 - Resultados para o cálculo dos parâmetros ϕ_1 a ϕ_{11} do modelo obtido para a produção de etanol



ANEXO

Figura 0.1 - Fluxograma lógico utilizado no tratamento de dados pelo Matlab R2014a

