

Abraão Brito Peixoto

Universidade Estadual de Feira de
Santana
abraaopeixoto@gmail.com

Nina Agujaro de Almeida

Universidade Estadual de Campinas
inalmeida@gmail.com

Francisco Maugeri Filho

Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Engenharia, Laboratório
de Engenharia de Bioprocessos,
Universidade Estadual de Campinas
maugeri@fea.unicamp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Endereço: BR-153 – Quadra Área
75.132-903 – Anápolis – revista.prp@ueg.br

Coordenação:

GERÊNCIA DE PESQUISA

Coordenação de Projetos e Publicações

Recebido em: 03/09/2013

Avaliado em: 22/11/2013

Publicação: 23 de Novembro de 2013

BIOETANOL DE FONTE AMILÁCEA PRODUZIDO POR LEVEDURAS SILVESTRES

Bioethanol produced from starch by wild yeasts

RESUMO

No contexto da biodiversidade, há expectativa de investigação acerca de produtos que amenizem os impactos ambientais. Enzimas como as amilases produzidas por microrganismos têm ampla aplicabilidade industrial, dentre as quais se destaca a produção de etanol com utilização sinérgica de bactérias e leveduras. O objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras silvestres que apresentassem atividade amilolítica; quantificar a glicose produzida a partir de amido e verificar a capacidade fermentativa das leveduras produtoras de amilases com produção de etanol. Do estoque de 182 linhagens testadas, 11 apresentaram capacidade amilolítica em meio sólido e foram testadas em meios submersos em três etapas distintas. A maior concentração de etanol (aproximadamente 8,0 g/L) foi alcançada pela linhagem LEB-AAQ5B em frascos de erlenmeyer. Para a fermentação em biorreatores, a maior concentração de etanol foi de aproximadamente 1,5 g/L para a linhagem LEB-AAQ5B. A atividade enzimática máxima foi de aproximadamente 9,5 U/mL para a linhagem LEB-T07.

Palavras-Chave: amilolítica; amilase; biomassa; fermentação.

ABSTRACT

According to the biodiversity context there are a lot of expectations in investigating products that can decrease the environmental impacts. The enzymes like amylases from microorganisms have a lot of applications in industries. Ethanol production with the synergistic use of bacteria and yeasts has singular importance. This paper had as goals the selection of yeasts with amylolytic activity and the quantification of glucose and ethanol from the degrading starch. 182 strains of yeasts were tested and 11 strains were selected, which produce amylase in solid media. These strains were tested in liquid media in three phases. The highest concentration of ethanol (about 8.0 g/L) was achieved by the strain LEB-AAQ5B after 168 hours of fermentation in poor medium. At the bioreactor, highest concentration of ethanol (about 1.5 g/L) was achieved by the strain LEB-AAQ5B. The maximum amylolytic activity was about 9.5 U/mL by strain LEB-T07 at 60 °C and pH 5.2.

Keywords: amylolytic, amylase; biomass; fermentation

1. INTRODUÇÃO

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. A utilização de biocombustível em automóveis reduz em 80 % a emissão de CO₂ na atmosfera (SWISSINFO, 2012).

A produção de bioetanol tem grande repercussão, pois se trata de um combustível com fonte renovável. Ainda, os cultivares destinados à produção de bioetanol, além de reduzirem a carga de CO₂ na atmosfera decorrente do plantio, 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 (MACEDO, 1992).

Dentre os cultivares destinados à produção de biocombustíveis, destacam-se a cana-de-açúcar e o milho. A produção de milho nos Estados Unidos representa 31 % da produção mundial de cereais e ocupa apenas 20 % das terras destinadas ao plantio desses. 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 destinadas ao plantio de variedades biotecnológicas (FAO, 2013).

No Brasil, segundo dados mais recentes do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção de milho em 2007 foi de aproximadamente 51,8 milhões de toneladas, o que representa um aumento médio de 24 % em relação ao mesmo período de 2006. O rendimento de 2007 foi de 3,8 T/ha, revelando aumento de 9,98 % em relação ao ano anterior. Em 2011 a quantidade produzida foi de pouco mais de 55,5 milhões de toneladas, o que representa um aumento de aproximadamente 7,6 % em relação ao ano de 2010. Para a safra de 2013, a previsão é de um aumento em torno de 17% em comparação com a safra de 2012 (IBGE, 2013).

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 das práticas atuais.

Neste contexto, abordando práticas inovadoras para a produção de etanol a partir de fontes amiláceas, o entendimento da degradação da molécula de amido por hidrólise enzimática promovida por amilases torna-se primordial.

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.

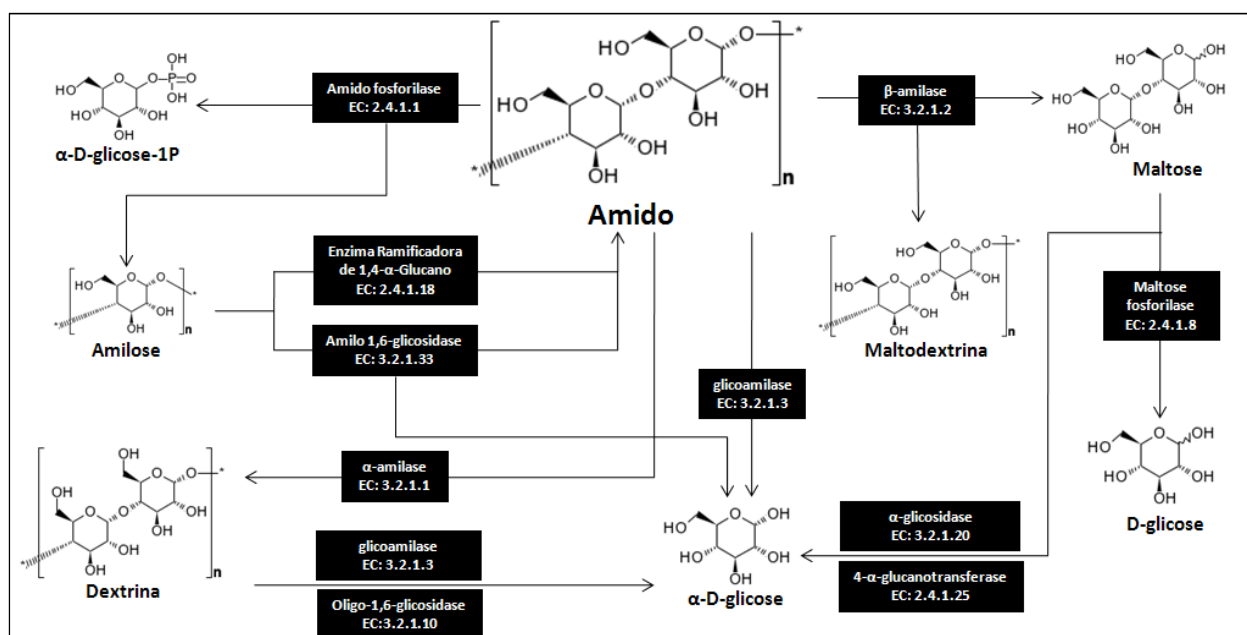


Figura 1 - Esquema da degradação da molécula de amido pelas amilases.

Contudo, as práticas convencionais para produção de etanol de segunda geração são antecipadas por hidrólises ácidas ou enzimáticas do amido com o intuito da obtenção de carboidratos mais simples, como a glicose ou a maltose. Esta prática antecipa a produção de bioetanol de fonte amilácea. Autores relatam essas etapas de hidrólise, seja por hidrólise enzimática (MODENBACH & NOKES, 2013; DU et. al., 2013), mais oneroso, seja por hidrólise ácida (ÇÖPÜR et. al., 2013), com geração indesejável de efluentes nocivos ao meio ambiente ou, ainda, uma reação sequencial entre as hidrólises ácida e enzimática (AVCI et. al., 2013).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento das Leveduras

HERNALSTEENS (2004) obteve amostras 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. Frações das amostras foram repicadas em tubos de ensaio com 10 mL de meio para enriquecimento, composto de 5 % de sacarose, 2 % extrato de levedura (pH 6,5) e incubadas a 30 °C por 24 horas.

Seguindo a metodologia de CHEN & LIU (1996), a cultura acima foi transferida para frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de meio de cultura “padrão”, composto de 5% de sacarose, 2% extrato de levedura, 2% NaNO₃, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,5% K₂HPO₄ (pH 6,5), e incubada a 30 °C, por 72 horas em agitador orbital a 200 rpm. Posteriormente, estas culturas foram diluídas convenientemente para plaqueamento (cultivo em placas de Petri) com meio

padrão contendo 2% de agar, e meio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient) por 72 horas a 30 °C. Para a inibição de bactérias, quando necessário, foram adicionados 50 ppm de ácido nalidíxico e ampicilina, após esterilização (121 °C/15 min) e resfriamento (50 °C) do meio (CASTRO, 1995).

O meio WLN também foi utilizado, uma vez que o uso deste pôde facilitar a diferenciação da morfologia das colônias (cor, forma, tamanho e textura). O meio WLN é composto de 4 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de casitona, 50 g/L de dextrose, 0,55 g/L de fosfato monopotássico, 0,425 g/L de cloreto de potássio, 0,125 g/L de cloreto de cálcio, 0,25 g/L de sulfato de magnésio, 0,0025 g/L de cloreto férrico, 0,0025 g/L de sulfato de manganês, 0,022 g/L de verde de bromocresol e 20 g/L de agar (MALTO, 1997).

As colônias assim isoladas foram repicadas em agar inclinado (2,0% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2,0% agar e pH 5,5 – meio GYMP), incubados a 30°C, até desenvolvimento das colônias, para posteriormente serem mantidas a 5°C

As linhagens isoladas foram repicadas em agar inclinado GYMP (2,0% glicose, 0,5% extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2,0% agar e pH 5,5), incubados a 30 °C, até desenvolvimento das colônias e mantidas a 5 °C para provimento da cultura estoque .

Seleção de Leveduras Amilolíticas

Linhagens 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 agar, 20 g/L. As placas foram mantidas em câmaras de incubação sob temperatura de 30 °C por 48h. Logo após, realizou-se a 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 claro ao redor da colônia, evidenciando ausência do amido solúvel original e, assim, a capacidade de produção de amilases.

Quantificação de Produtos Gerados

Etapas 1:

Preparo do inóculo: as culturas de leveduras já selecionadas de acordo com as etapas “Isolamento das Leveduras” e “Seleção de Leveduras Amilolíticas” foram repicadas separadamente a partir dos tubos da cultura estoque para meio reacional estéril (amido solúvel, 20 g/L; peptona, 10 g/L e extrato de levedura, 10 g/L com pH ajustado para 5,5 com HCl), que foi mantido sob agitação de 100 rpm em frascos de Erlenmeyer aletados a 30 °C por 24 h.

Processo fermentativo: após o teste de seleção inicial para averiguação da capacidade amilolítica das linhagens estudadas, as leveduras produtoras de amilases foram submetidas à fermentação em volume de 100 mL de meio reacional composto de amido solúvel, 20 g/L; peptona, 10 g/L e extrato de levedura, 10 g/L com pH ajustado para 5,5 com HCl. A adição do inóculo foi realizada na proporção de 1:10 (inóculo:meio fermentativo). Os frascos contendo 100 mL de meio reacional foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 12, 24, 36 e 48 h, sendo que após 48 h de processo, os frascos foram mantidos em temperatura ambiente e sem agitação até completarem-se 180 h (Tabela 2). O pH do meio fermentado foi medido ao final de cada processo fermentativo além de coloração de Gram para verificação de possíveis contaminações por bactérias.

Análise dos produtos gerados: 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 e injetados em HPLC (coluna HPX-87H, Bio-Rad, Estados Unidos da América) para quantificação de glicose e etanol produzidos a partir do amido original. Um esquema deste processo pode ser apreciado por meio da Figura 2.

Etapa 2:

Preparo do inóculo: similar à Etapa 1.

Processo fermentativo: foi seguido o mesmo procedimento da Etapa 1, mas com uma composição diferenciada do meio reacional (amido solúvel, 100,0 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) com pH ajustado para 5,5 com HCl. Este procedimento foi adotado tendo em vista um alto custo da composição do meio utilizado na Etapa 1.

Crescimento celular: a massa seca foi determinada para acompanhamento do crescimento celular. Para este caso, alíquotas de 1 mL foram coletadas de cada frasco em meio fermentativo desde o tem zero em intervalos regulares (Figura 5). Este volume foi adicionado em placas de Petri previamente pesadas em balança analítica após 1 h em dessecador. As massas das placas com alíquotas adicionadas foram medidas a cada 24 h até massa constante após permanência em estufa com temperatura controlada a 70 °C. A massa seca pôde então ser determinada, sendo considerada a diferença entre a massa medida com a placa vazia e a massa medida após peso constante. Essa diferença foi considerada como sendo massa seca de células presentes no meio fermentativo (Figura 5). A fração remanescente de amido foi acompanhada seguindo metodologia de Antrona (SJORGREEN et. al., 1938).

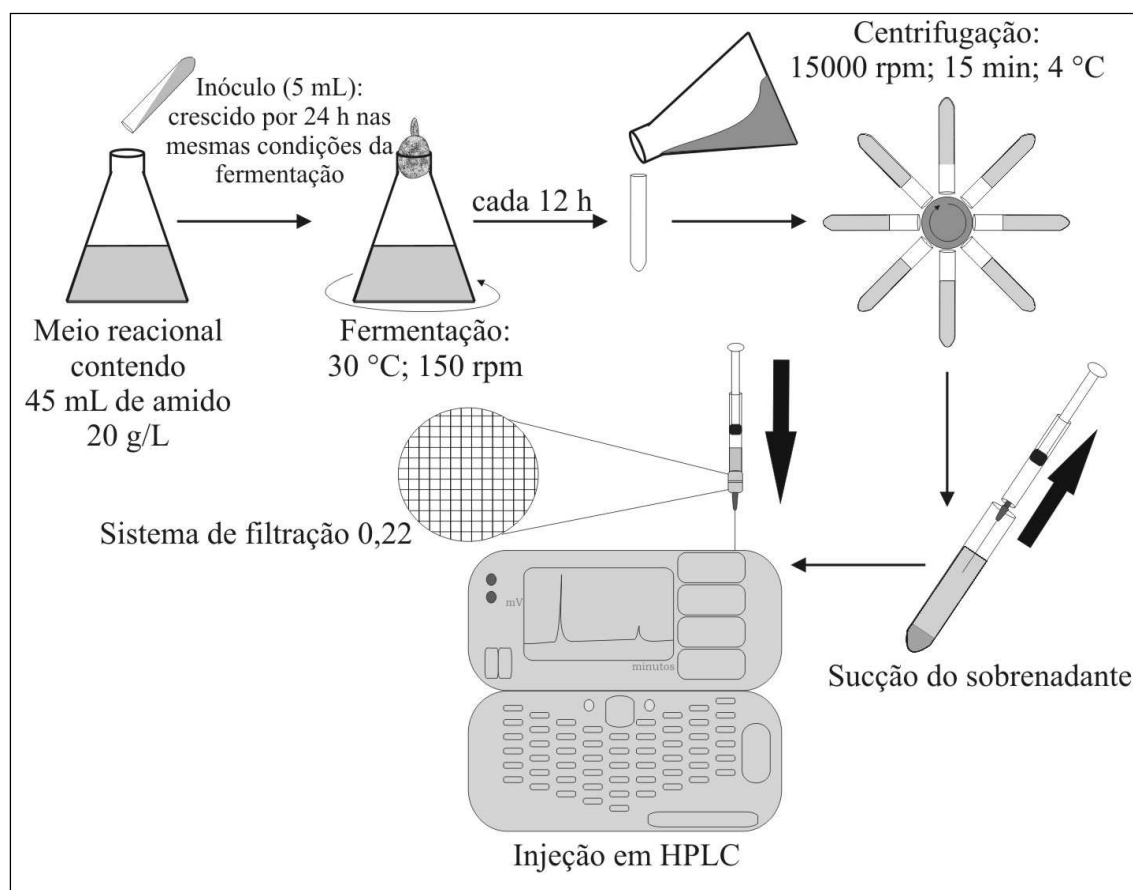


Figura 2– Procedimento experimental da fermentação do amido pelas leveduras até formação de glicose e etanol com respectiva detecção em HPLC.

Análise dos produtos gerados: Para análise da produção de etanol, glicerol e ácido acético, alíquotas de 1 mL foram coletadas de cada frasco em meio fermentativo desde o tempo zero em intervalos regulares (Figura 5). A alíquota coletada foi filtrada em poros de 0,22 μm e analisadas. Foi utilizada coluna HyperREZ XP (Thermo Scientific, Estados Unidos da América) em HPLC, seguindo proposta similar à primeira etapa (Figura 2).

Etapas 3:

Nesta etapa foi avaliada a capacidade de produção de etanol a partir de amido com utilização de meio com controle de pH em biorreatores automatizados (Bioflo III, New Brunswick, Eppendorf, Estados Unidos da América; ver Figura 3).

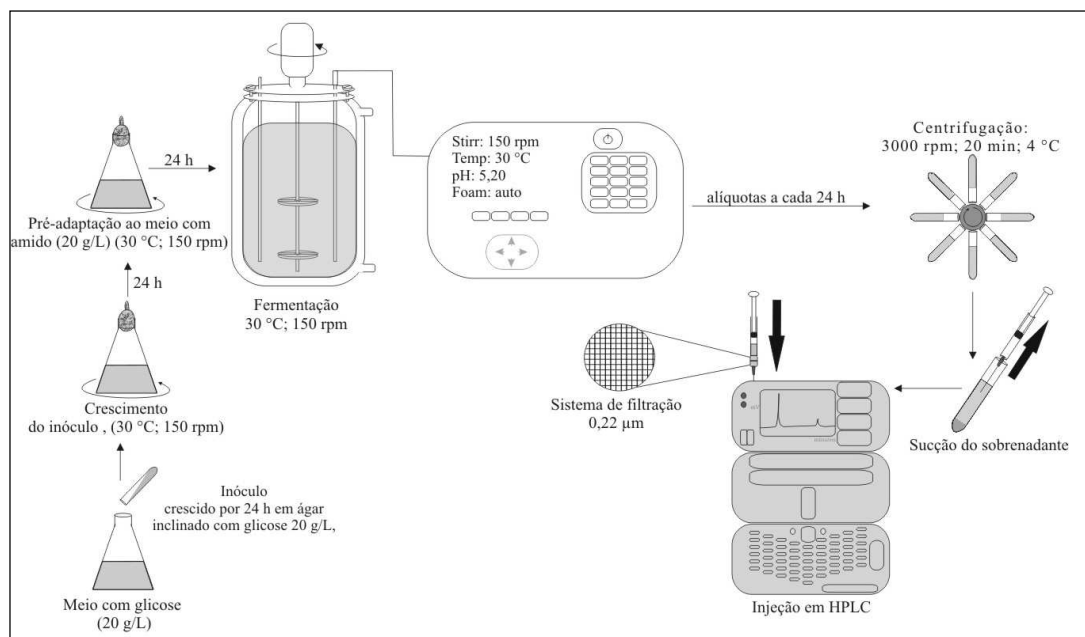


Figura 3 - Procedimento experimental da fermentação do amido pelas leveduras seguindo mecanismo proposto na Etapa 3 da fermentação.

Preparo do inóculo: similar à Etapa 1.

Processo fermentativo: o meio reacional foi elaborado com a seguinte composição: 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 com pH ajustado para 5,5 com HCl.

Foram realizados três distintos procedimentos. A saber:

1) Fermentação sem aeração com pH controlado em 3,5: nesta etapa, o pH da fermentação foi ajustado para 3,5 e controlado para este valor durante toda a fermentação com utilização de NaOH 2,0 M. O processo foi mantido sem aeração durante todo tempo sob agitação de 150 rpm.

Análise dos produtos gerados: alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 h para análise das concentrações de amido residual, etanol e ácidos orgânicos formados, além da análise de crescimento celular e atividade de amilases presentes no meio (similar à Etapa 2).

2) Fermentação com aeração sem controle de pH: o pH inicial da fermentação foi equilibrado para 5,0 com HCl. A variação nos valores de pH foi acompanhada a cada 24 h de fermentação. A aeração foi controlada para um valor mínimo de maneira que o equipamento não acusava leitura para tal valor de aeração. A agitação foi mantida em 150 rpm.

Análise dos produtos gerados: alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 h para análise das concentrações de amido residual, etanol e ácidos orgânicos formados, além da análise de crescimento celular e atividade de amilases presentes no meio para a linhagem LEB-T07 (similar à Etapa 2).

3) **Fermentação com aeração e pH controlado em 4,0:** após a segunda etapa, foi percebida grande variação de pH durante o processo. Dessa forma, na terceira etapa, foi adotado o controle de pH para um valor mínimo de 4,0. O pH foi controlado com NaOH 2,0 M utilizando o padrão de automação do biorreator Bioflo III por meio de bomba peristáltica associada à plataforma do equipamento. A aeração foi mantida em torno de 1,0 vvm com ajuste manual em rotâmetro externo ao biorreator. A agitação foi mantida em 150 rpm durante todo o processo.

Análise dos produtos gerados: alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 h para análise das concentrações de amido residual, etanol e ácidos orgânicos formados, além da análise de crescimento celular e atividade de amilases presentes no meio (similar à Etapa 2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das Leveduras

Foram selecionadas leveduras produtoras de amilases em meio sólido de acordo com o resultado positivo exposto por meio da Figura 4.

Após esta etapa, as linhagens selecionadas foram submetidas à fermentação em meios submersos agitados (Tabela 1).

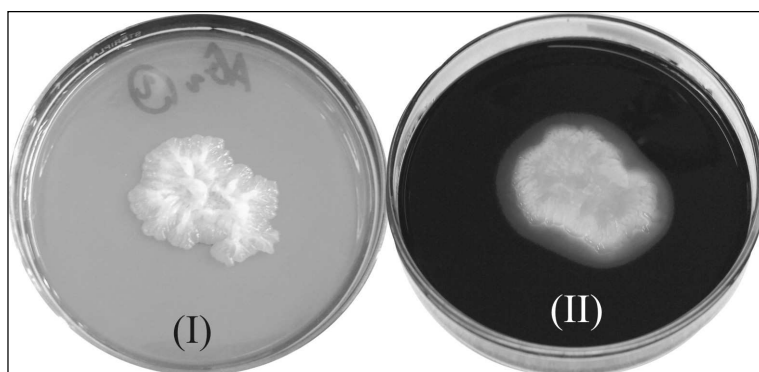


Figura 4 – Resultado do teste de atividade enzimática em meio sólido antes (I) e depois (II) da adição da solução de lugol.

Tabela 1- Linhagens de leveduras selecionadas para fermentação em meios submersos e respectiva origem.

Código da linhagem	Origem	Código da linhagem	Origem
LEB-T07	Mata Atlântica I	LEB-AAQ5B	Cerrado
LEB-AAQ5	Cerrado	LEB-AAP7	Cerrado
LEB-T08	Mata Atlântica I	LEB-AI7	Floresta Amazônica
LEB-AAN2	Cerrado	LEB-AAT2	Cerrado
LEB-AAA3	Cerrado	LEB-AAD5	Cerrado
		LEB-AAT4	Cerrado

Quantificação de glicose e etanol

Etapa 1

Após análises dos dados adquiridos, foram comparados a produção de etanol e glicose com a variação de pH do meio fermentado segundo exposto pela Tabela 2.

Tabela 2 – Análises das concentrações de etanol e glicose e acompanhamento da variação de pH (Etapa 1).

Linhagens	Etanol (g/L)					Glicose (g/L)					pH				
	12 h	24 h	36 h	48 h	180 h	12 h	24 h	36 h	48 h	180 h	12 h	24 h	36 h	48 h	180 h
LEB-T07	-	-	1,56	0,51	0,51	-	-	1,50	0,085	0,11	5,50	5,84	5,92	5,78	5,80
LEB-AAQ5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	5,50	7,92	8,50	8,69	8,70
LEB-T08	-	-	-	-	-	-	0,42	-	-	0,15	5,50	5,83	7,94	8,45	8,48
LEB-AAN2	-	0,80	0,56	0,57	0,54	-	-	-	-	0,057	5,50	8,00	8,50	8,60	8,62
LEB-AAA3	-	0,99	0,60	0,60	0,51	-	-	-	-	0,065	5,50	8,11	8,55	8,63	8,61
LEB-AAQ5B	-	1,1	-	0,28	0,19	-	0,86	0,17	0,29	0,92	5,50	6,58	7,56	7,50	6,85
LEB-AAP7	-	1,2	0,57	0,55	0,46	-	1,20	0,12	0,045	0,055	5,50	5,74	5,75	6,13	7,79
LEB-AI7	-	1,3	0,53	0,52	0,41	-	-	-	-	-	5,50	7,69	8,39	8,69	8,75
LEB-AAT2	-	1,4	0,53	0,60	0,47	-	-	-	-	0,0082	5,50	7,63	7,87	7,95	7,89
LEB-AAD5	-	1,4	0,58	0,58	0,42	-	1,5	0,13	0,14	0,19	5,50	5,83	5,69	5,75	5,68
LEB-AAT4	-	1,5	0,60	0,59	0,46	-	-	-	-	-	5,50	8,02	8,54	8,65	8,67

Pode-se observar na Tabela 2 que praticamente todas as leveduras evidenciaram atividade no meio fermentativo com produção de etanol com exceção da LEB-AAQ5 e da LEB-T08. O máximo valor obtido para a produção de etanol foi de 1,56 g/L pela linhagem LEB-T07 após 24 h. Para esta mesma linhagem, foi detectada maior concentração de glicose durante a fermentação (1,49 g/100 g de meio) depois de 24 h. Concentrações de etanol significativamente maiores (10,3 mL/100 mL, após 144 h) foram detectadas por HAAN et. al. (2013) em trabalhos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* com modificações genéticas e inserção de genes de *Aspergillus awamori* e *Debaryomyces occidentalis*. Neste mesmo trabalho, a taxa de conversão de amido em glicose foi de 79 %.

Etapa 2

Foram comparados a produção de etanol, ácido acético e glicerol com a variação de pH e massa seca do meio fermentado. Foi observado que a linhagem LEB-AAQ5B obteve maior produção de etanol (aproximadamente 8,0 g/L) – ver Figura 5 (A). Esta linhagem foi selecionada para a etapa de fermentação em fermentadores automatizados para posterior otimização do processo.

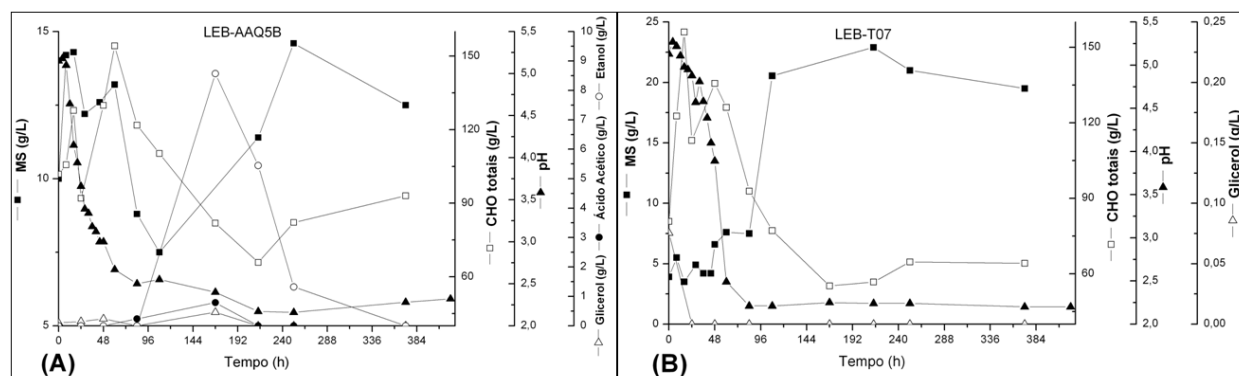


Figura 5 - Evolução de parâmetros fermentativos para as linhagens de levedura LEB-AAQ5B (A) e LEB-T07 (B), seguindo mecanismo proposto pela etapa 2.

Também para efeito de análises posteriores, foi selecionada a linhagem de levedura LEB-T07, destinada à produção de enzimas, tendo em vista maior degradação do amido original e aumento significativo da massa seca mesmo não apresentando produção de etanol nessas condições [Figura 5 (B)].

Percebe-se que o comportamento das linhagens no meio fermentativo foi diferenciado em relação à 1ª estratégia, principalmente no que diz respeito aos valores de pH que, agora, sofreram decréscimo durante a fermentação, exceto para as linhagens LEB-AAN2 e LEB-T08. O decréscimo nos valores de pH podem ter sido acentuados devido à formação de ácido acético durante a fermentação.

Ainda, a linhagem LEB-T07, produtora de etanol na 1ª estratégia fermentativa, passou a não manifestar este potencial produtivo nas condições sugeridas na 2ª estratégia. Da mesma forma, as linhagens LEB-AAN2, LEB-AAP7, LEB-AI7, LEB-AAT2 e LEB-AAT4 manifestaram produção de etanol apenas nas condições sugeridas na 1ª estratégia de fermentação.

Observa-se também que apenas as linhagens LEB-AAD5 e LEB-AAQ5B produziram etanol tanto na 1ª quanto na 2ª estratégia de fermentação sugeridas.

Etapa 3

Para a linhagem de levedura LEB-AAQ5B foram analisados concentrações de produtos formados tais como glicerol, ácido acético e etanol sob diferentes condições a fim de preestabelecer parâmetros que fortaleçam argumentos necessários à confecção do DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) a posteriori.

A princípio foi estabelecida a condição de pH equilibrado em 3,5 e sem aeração [Figura 6 (A)].

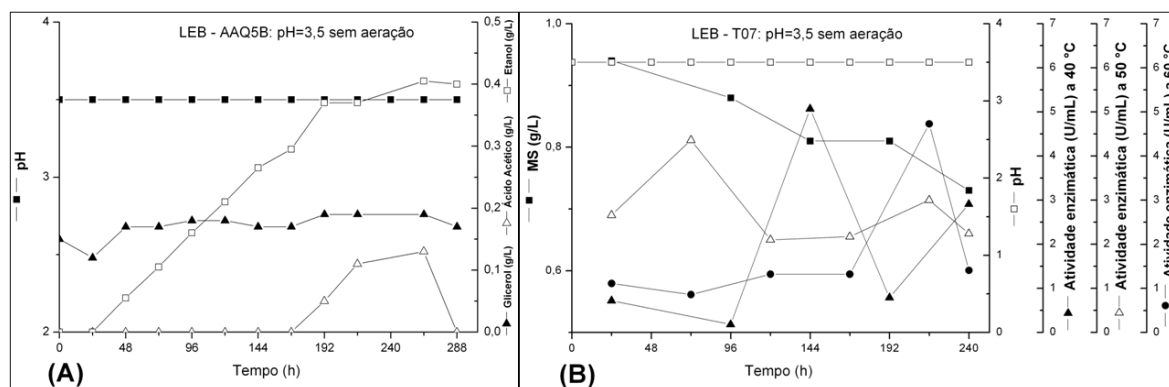


Figura 6 – Comportamento do crescimento das leveduras LEB-AAQ5B (A) e LEB-T07 (B) em meio fermentativo com pH controlado em 3,5 e não aerado.

De acordo com os dados apresentados, percebe-se significativo aumento da produção de etanol. Todavia, os baixos valores obtidos podem ser devidos a uma provável inibição pela concentração do substrato (75 g/L) e, ainda, pelo estresse causado pelo ajuste de pH em 3,5 desde o início da fermentação. A insuficiência de oxigênio também pode ter inibido o crescimento e, consequentemente, a produção do álcool.

Para a produção de enzimas pela linhagem LEB-T07 [Figura 6 (B)], percebe-se decréscimo dos valores referentes à massa celular devido à alta concentração de substrato no início da fermentação. As alíquotas coletadas apresentaram em sua composição, além de células, altas concentrações de amido depositado no meio cujo coeficiente de solubilidade para o amido nessa temperatura (30 °C) está aquém do necessário para fazê-lo totalmente solúvel. Ainda, os baixos valores de atividade enzimática podem ser atribuídos à baixa concentração de fonte de nitrogênio utilizada $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4; 2,0 \text{ g/L}]$, o que deprime a formação de proteínas cuja fonte primária é o composto nitrogenado.

No passo seguinte, as condições do meio passaram a ser de pH não controlado e com aeração mínima (valor não acusado pelo equipamento) – Figura 7.

Nas condições apresentadas, a linhagem de levedura LEB-AAQ5B não apresentou formação de nenhum dos produtos estudados apesar de manifestar alguma atividade, evidenciada pela variação de pH. A formação de ácidos não foi detectada nas condições de utilização do HPLC. Todavia, a formação de produtos acidificantes é evidente e será estudada com maior aprofundamento quanto à sua formação.

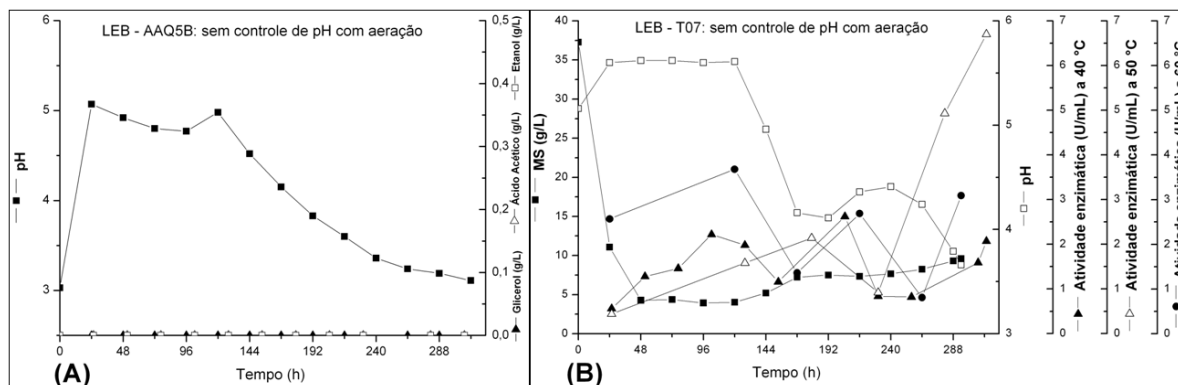


Figura 7 - Comportamento do crescimento das leveduras LEB-AAQ5B (A) e LEB-T07 (B) em meio fermentativo com pH não controlado sob aeração.

Nesta condição para a produção enzimática é observado declínio do valor de massa celular, também pelo fato da condição de solubilidade do meio como já citado. Contudo, após 144 horas de fermentação, percebe-se aumento da massa celular, acompanhado de decréscimo nos valores de pH, predizendo melhores condições de crescimento de células em pH com valores reduzidos, em torno de 3,5. Também é evidenciada atividade enzimática em torno de 7,0 U/mL a 60 °C para enzimas produzidas após 288 horas de fermentação.

Em mais uma etapa de experimentos, o meio fermentativo teve pH equilibrado para valores próximos de 5,0 no início da reação (pH de partida). Após o início da fermentação, o equipamento foi ajustado para controlar o pH em torno de 4,0 para a linhagem LEB-AAQ5B e em torno de 3,5 para a linhagem LEB-T07. O pH foi controlado com utilização de NaOH 2,0 M. O sistema foi mantido aerado durante todo processo com vazão de aproximadamente 1,0 vvm. Os resultados são expostos por meio da Figura 8.

Para a linhagem LEB-AAQ5B nessas condições, percebe-se forte aumento de pH (de aproximadamente 5,0 para aproximadamente 6,5 em 48 h) seguido de forte redução até valores próximos de 4,0. A produção de etanol se mostra baixa (aproximadamente 1,5 g/L) enquanto o ácido acético começa a ser produzido após 192 horas de fermentação, chegando a valores próximos de 4,5 g/L após 288 de fermentação. Não foi detectada produção de glicérol durante o processo.

O maior valor para a atividade enzimática pela linhagem LEB-T07 foi alcançado após 120 h de fermentação, quando o pH estava em torno de 4,2. A enzima produzida apresentou atividade em torno de 9,5 U/mL a 60 °C. Em menores valores de temperatura, a enzima diminui sua atividade para valores em torno de 2,0 U/mL a 40 °C. COSTA et. al. (2011) trabalharam com leveduras amilolíticas isoladas de batata doce e a maior atividade enzimática observada foi de 0,48 U/mL.

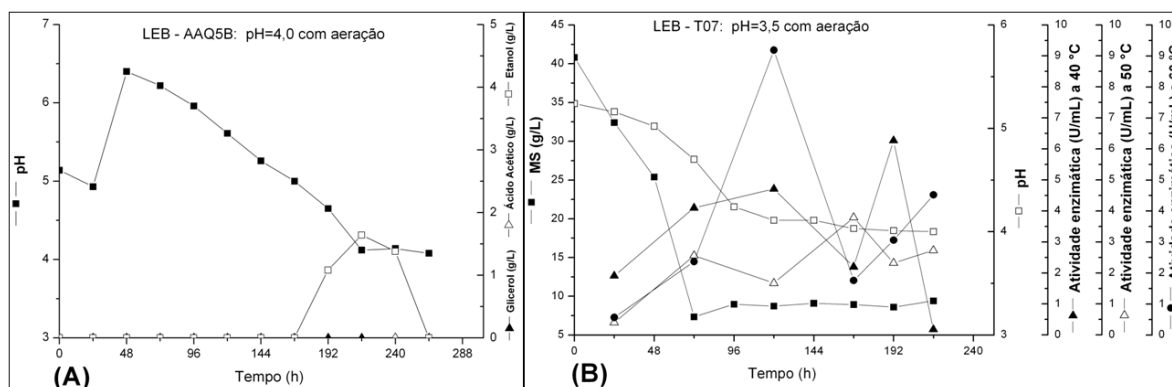


Figura 8 - Comportamento do crescimento das leveduras LEB-AAQ5B (A) e LEB-T07 (B) em meio fermentativo com pH controlado com aeração.

4. CONCLUSÕES

Das 182 linhagens coletadas em diferentes biomas brasileiros, 11 apresentaram atividade amilolítica em meio sólido, que constituem um estoque promissor em futuros estudos com vistas tanto para a produção de bioetanol quanto para enzimas amilolíticas.

Na primeira fase dos trabalhos realizados, percebeu-se distinto comportamento quando os microrganismos são submetidos à fermentação: em meio rico com utilização de frascos de Erlenmeyer (etapa 1); em meio pobre, mas ainda em frascos de Erlenmeyer (etapa 2) e meio pobre em biorreatores (etapa 3).

Na etapa 1, os efeitos observados durante o processo pode ser considerado satisfatório tendo observado que os microrganismos provocam aumento de pH no meio fermentativo, provavelmente pela liberação de compostos aminados oriundos dos componentes orgânicos da composição do meio. Esse aumento de pH provoca estresse metabólico e inibe tanto o crescimento celular quanto a produção de compostos como etanol ou ácidos. A produção de etanol máxima foi de 1,56 g/L produzidos pela linhagem LEB-T07 após 36 h de fermentação. Contudo, etapas de melhoramento genético tanto para amplificar a atividade de enzimas quanto o desempenho fermentativo podem agregar valores de conversão do amido em etanol de modo a possibilitar ampliação da escala produtiva.

Na etapa 2, a modificação da composição do meio fermentativo, de meio orgânico para meio não orgânico, provoca uma reação inversa com relação à mudança nos valores de pH durante a fermentação. O pH diminui durante a fermentação, chegando a valores próximos de 2,0. A máxima concentração de etanol (8,57 g/L) foi observada na fermentação pela linhagem LEB-AAQ5B, o que denota uma produtividade interessante e promissora para aprofundamentos de estudo.

Para as condições fermentativas propostas na Etapa 2, a linhagem LEB-T07 não produziu etanol, porém sua capacidade de crescimento celular foi observada, alcançando

aproximadamente 22,0 g/L de células após 212 h de fermentação, o que prediz potencial produção de enzimas.

Da Etapa 2, apenas duas linhagens foram selecionadas (LEB-AAQ5B e LEB-T07) para a fase posterior, tendo em vista maiores produtividades para etanol e massa celular. Neste contexto, pode-se inferir grande potencial para produção de enzimas pela linhagem LEB-T07 quanto de etanol pela linhagem LEB-AAQ5B a partir de um planejamento de experimentos baseado em DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)

Na etapa 3, definiram-se as capacidades produtivas de etanol e amilases, consideradas como boas apesar de o comportamento ter sido variado com relação às mudanças nos valores de pH. A produção de etanol pela linhagem LEB-AAQ5B alcançou valor máximo (1,64 g/L) na condição de pH controlado em 4,0 (valor mínimo) com aeração. A atividade enzimática analisada para a linhagem LEB-T07 foi máxima (9,19 U/mL) para enzimas produzidas após 120 h de fermentação nas condições de 60 °C e pH 5,2 para o teste de atividade enzimática.

Portanto, a condição de processo considerada de maior interesse para a produção de etanol pela linhagem LEB-AAQ5B foi aquela proposta na Etapa 2, onde a concentração máxima de etanol foi de 8,57 g/L. Esta condição deve ser testada em escala piloto com foco em escalonamento industrial.

Em contrapartida, a condição de processo para a produção de enzimas com maior atividade foi observada na Etapa 3 com utilização da linhagem LEB-T07. Todavia, observa-se crescimento celular significativo na Etapa 2 por esta mesma linhagem, podendo indicar boa produção de enzimas. Para este caso, estudos mais aprofundados serão devidamente considerados com vistas à otimização tanto da produção de enzimas quanto da conversão de amido em etanol.

Portanto, conclui-se que o sucesso pretendido para a produção de etanol a partir de amido depende da eficiência hidrolítica. Essa característica remete a estudos de processos fermentativos com utilização de ambas as linhagens, LEB-T07 e LEB-AAQ5B, em sociedade com vistas à disponibilização da glicose oriunda da hidrólise, característica típica observada pela atuação da linhagem LEB-T07, concomitantemente à fermentação típica observada em estudos com a linhagem LEB-AAQ5B.

5. REFERÊNCIAS

AVCI, A.; SAHA, B. C.; KENNEDY, G. J.; COTTA, M. A. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. **Bioresource Technology**, 142, 312–319, 2013.

CASTRO, M. M. S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica**. Campinas, 1995, 124 p. Dissertação (Mestre em

- Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- CHEN, W.; LIU, C. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enz. Microb. Tech.** 02, 153-160, 1996.
- ÇÖPÜR, Y.; TOZLUOĞLU, A.; UÇAR, M. B. NaBH_4 pretreatment in bioethanol production of corn stalks. **Journal of Wood Chemistry and Technology**. 33, 125-143, 2013.
- COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **RevBio - Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**. 17, 15-24, 2011.
- DU, J.; ZHANG, F.; LI, Y.; ZHANG, H.; LIANG, J.; ZHENG, H.; HUANG, H. Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering** (in press), 1-9, 2013.
- FAO. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 24 de julho de 2013.
- HANN, R.; KROUKAMP, H.; MERT, M.; BLOOM, M.; GÖRGENS, J. F.; ZYL, W. H.; Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for next generation ethanol production. **J Chem Technol Biotechnol**. 88: 983-991, 2013
- HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras**. Campinas, 2004 80 p. Tese (Doutora em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 24 de julho de 2013.
- JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3ª ed. Editora Acribia, 804 p., 1992.
- MACEDO, I. C. The sugarcane agro-industry – its contribution to reducing CO2 emissions in Brazil. **Biomass and Bioenergy**. 3, 77-80, 1992.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy** 56, 526-544, 2013.
- ;SJORGREEN, B.; NORDENSKJOLD, T.; HOLMGREN, H. WÖLLERSTRON, J. Beitrag zur kenntnis des lebenhythmik. **Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere**. 46, 240-47, 1938.
- SWISSINFO. **Bioetanol chega na Suíça**. Disponível em: <<http://www.swissinfo.org/por/index.html>>. Acesso em: 23 de agosto de 2012.
- TORNEY, F.; MOELLER, L.; SCARPA, A.; WANG, K. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. **Current Opinion in Biotechnology**, 18, 193-199, 2007.
- UGURU, G. C.; AKINYANJU, J. A.; SANI, A. The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. **Enz. Microb. Tech.** 21, 48-51, 1997.