

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 Ailton Conceição Bispo², Carlos Francisco Sampaio Bonafé³, Ernesto Acosta Martínez⁴

¹ 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, 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; ³ Professor 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; ⁴ Professor 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

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

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

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 a adição às leveduras de micro-organismos etanologênicos que degradem a xilose ou a manipulação por engenharia genética com mecanismo de expressão gênica de modo que um só micro-organismo 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.

Material e Métodos

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).

Meio reacional para fermentação

Amido solúvel (75,0 g/L), KH_2PO_4 (5,0 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (2,0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (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.

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 àquele. Sondas de pH e pO_2 Mettler Toledo (Greifensee, Suíça). Filtros

microbiológicos para ar comprimido com poros de 0,22 μm .

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.

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.

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.

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).

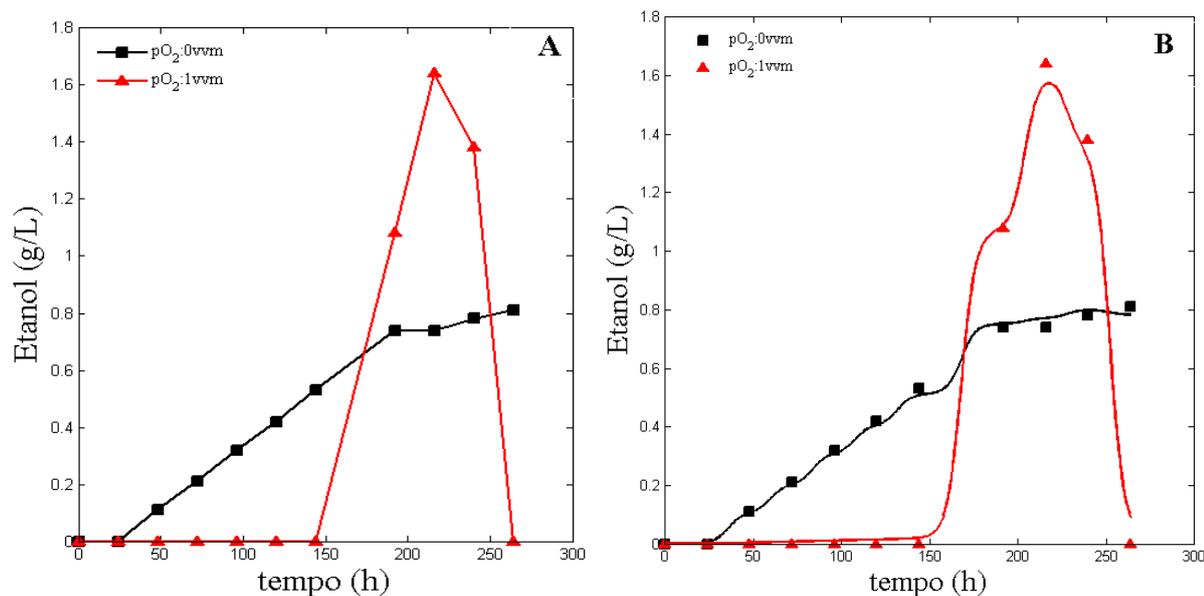


Figura 1 - Dados experimentais obtidos para a concentração de etanol (A) nas condições sem aeração (■) e com aeração de 1,0 vvm (▲) e a aproximação observada por meio do modelo matemático adotado para o estudo do processo (B).

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 micro-organismos 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 2 e a Figura 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.

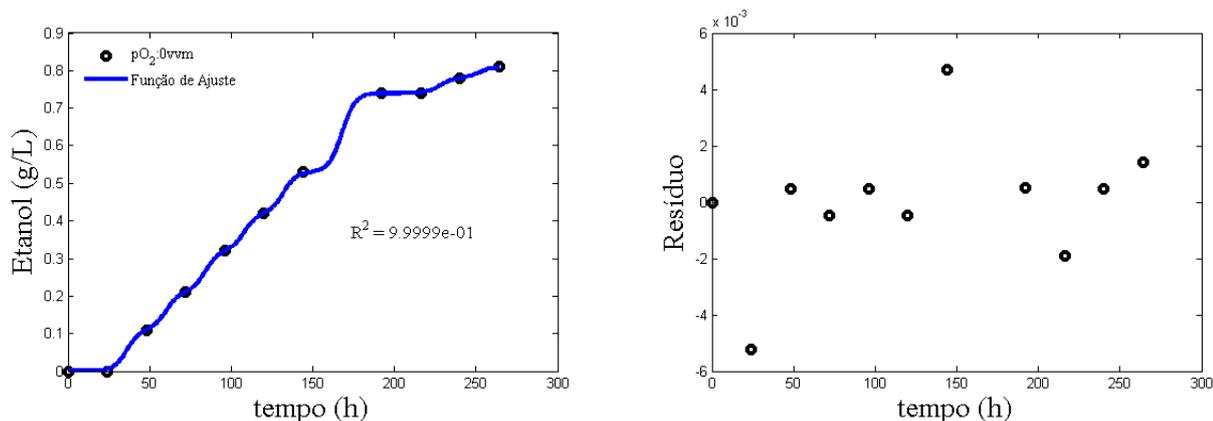


Figura 2 – Ajuste dos pontos experimentais por meio do modelo matemático adotado para o estudo (à esquerda) e os resíduos calculados para cada ponto experimental (à direita) na condição de reação sem aeração.

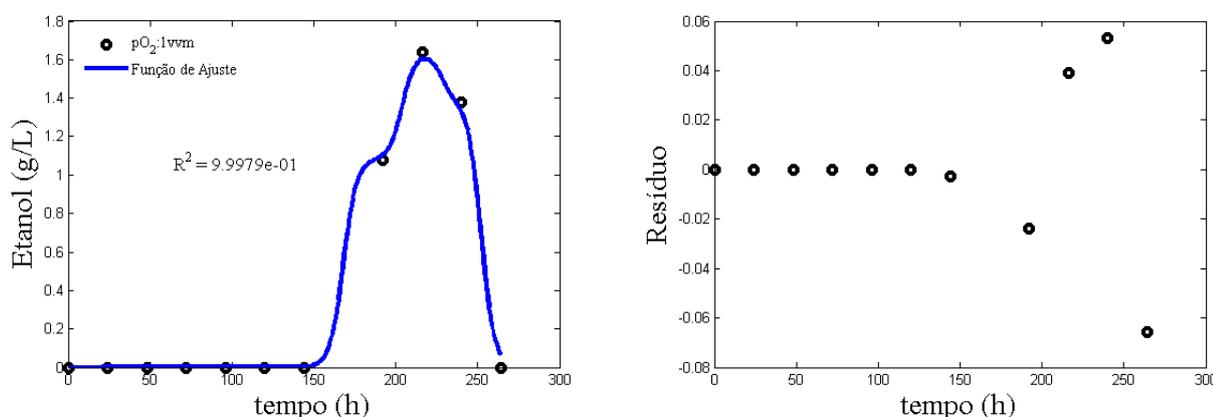


Figura 3 – Ajuste dos pontos experimentais por meio do modelo matemático adotado para o estudo (à esquerda) e os resíduos calculados para cada ponto experimental (à direita) na condição de reação sob aeração de 1,0 vvm.

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 previsto 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 4).

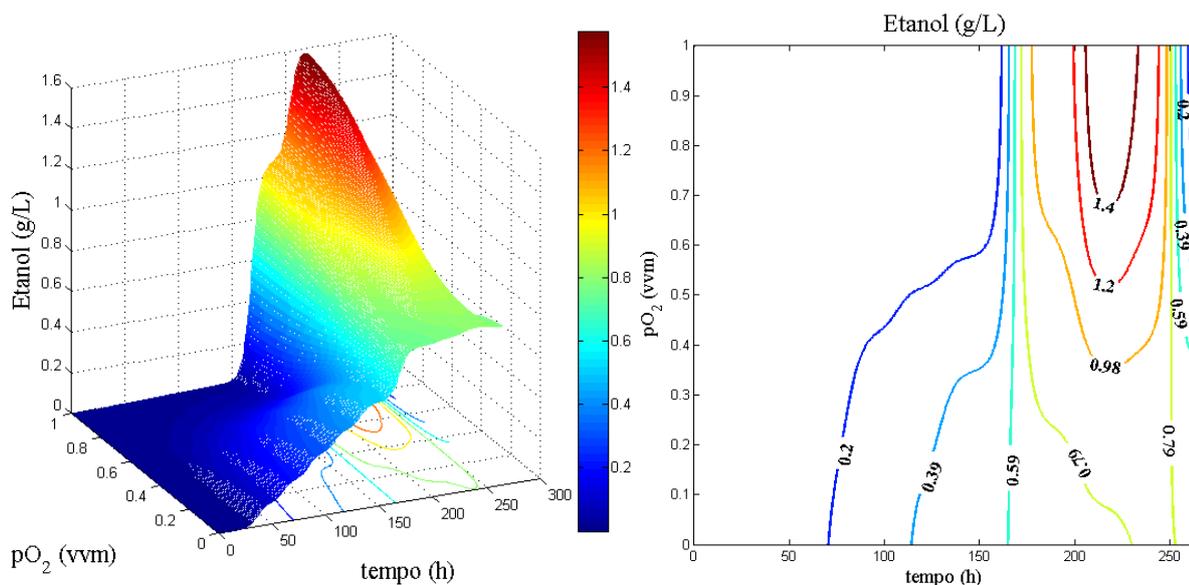


Figura 4 - Superfície de resposta (à esquerda) e curva de contorno (à direita) para a concentração de etanol produzido pela linhagem LEB-AAQ5B nas condições experimentais estabelecidas para aeração de 0,0 e 1,0 vvm.

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 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.

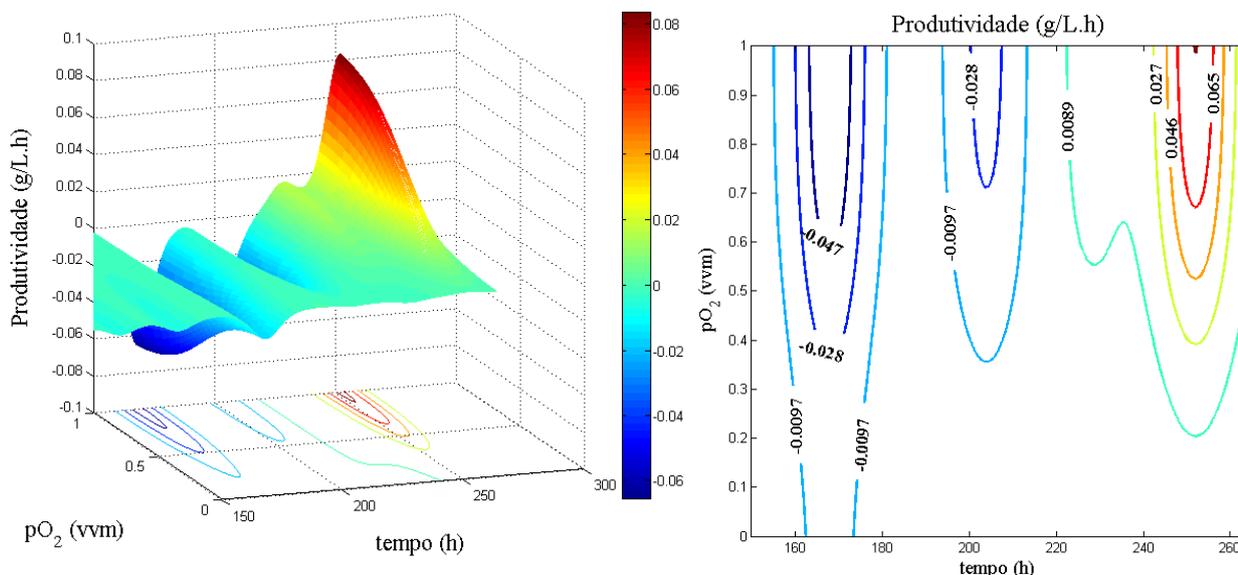


Figura 5 – Superfície de resposta (à esquerda) e curvas de contorno (à direita) resultantes da derivação das equações de ajuste dos dados experimentais relativos às bateladas nas condições estudadas.

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 micro-organismos.

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 micro-organismos. Por outro lado, a formação de etanol causa uma modificação metabólica nas células, pois se trata de um produto tóxico aos micro-organismos 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 micro-organismos se adaptam às condições do meio, passam a produzir etanol após 150 h de fermentação e, pela escassez de substrato ou excesso de micro-organismos, 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 micro-organismos 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 micro-organismos capazes de hidrolisar os polímeros glicosídicos e transformá-los em insumos de interesse industrial com reduzido impacto sobre o meio ambiente deve ser incentivada.

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, 2016