

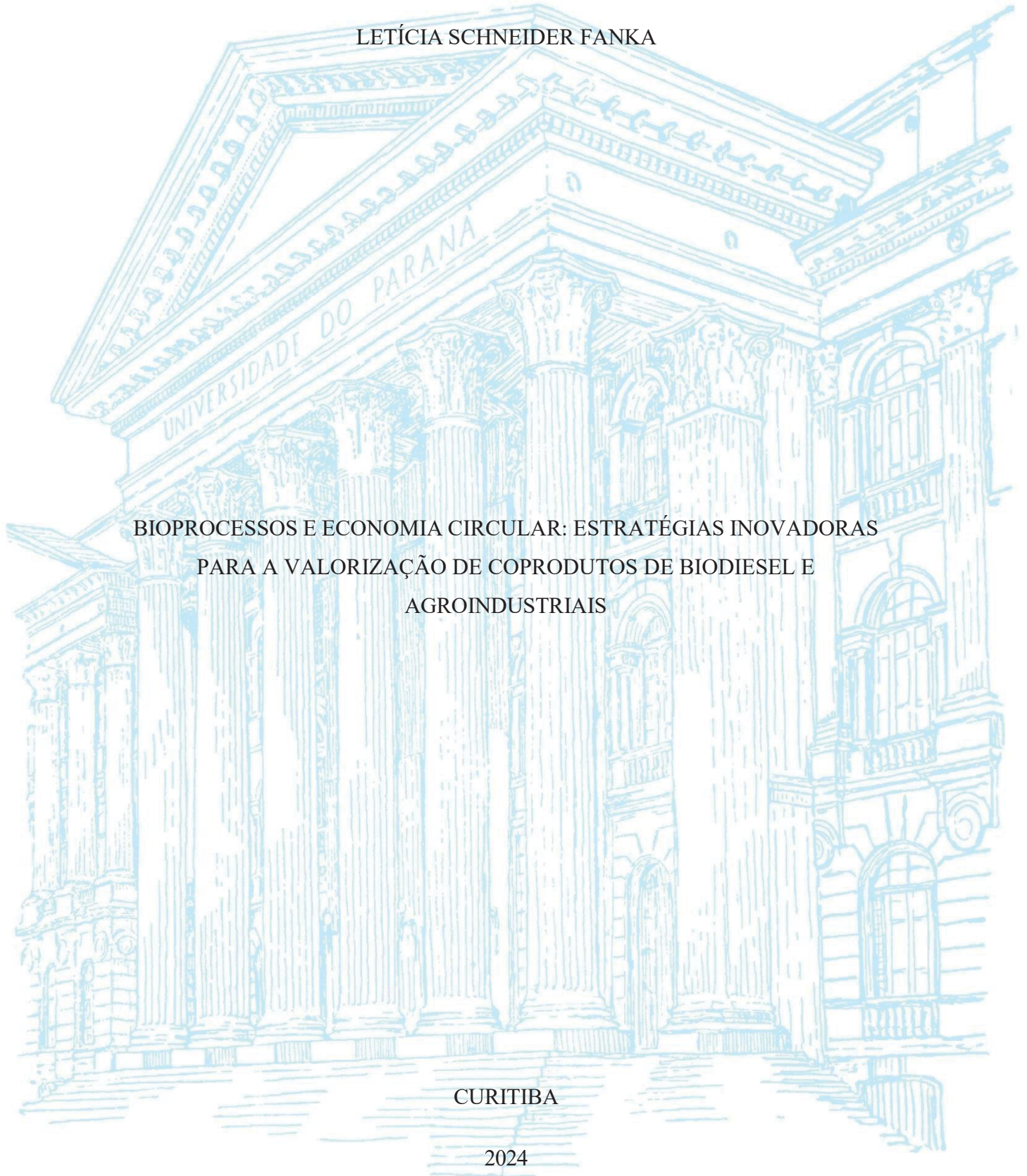
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA SCHNEIDER FANKA

BIOPROCESSOS E ECONOMIA CIRCULAR: ESTRATÉGIAS INOVADORAS
PARA A VALORIZAÇÃO DE COPRODUTOS DE BIODIESEL E
AGROINDUSTRIAIS

CURITIBA

2024



LETÍCIA SCHNEIDER FANKA

BIOPROCESSOS E ECONOMIA CIRCULAR: ESTRATÉGIAS INOVADORAS
PARA A VALORIZAÇÃO DE COPRODUTOS DE BIODIESEL E
AGROINDUSTRIAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Coorientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Fanka, Leticia Schneider

Bioprocessos e economia circular: estratégias inovadoras para a valorização de coprodutos de biodiesel e agroindustriais / Leticia Schneider Fanka. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol

Coorientador: Júlio César de Carvalho

1. Ômega-3 (Ácidos graxos). 2. Microalgas. 3. Sustentabilidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Carvalho, Júlio César de. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LETÍCIA SCHNEIDER FANKA** intitulada: **BIOPROCESSOS E ECONOMIA CIRCULAR: ESTRATÉGIAS INOVADORAS PARA A VALORIZAÇÃO DE COPRODUTOS DE BIODIESEL E AGROINDUSTRIAIS**, sob orientação do Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 03 de Abril de 2024.

CARLOS RICARDO SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

DENISSE TATIANA MOLINA AULESTIA
Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

JULIO CESAR DE CARVALHO
Coorientador(a)

RESUMO

O presente trabalho aborda o conceito de economia circular, envolvendo diversos bioprocessos, desde a autólise de leveduras, um processo chave para a biotecnologia e as indústrias alimentícia e farmacêutica, até o uso de efluentes agroindustriais como substratos no cultivo de microalgas, e a fermentação de *Schizochytrium limacinum* para a produção de DHA e lipídios, finalizando com a inovação de um modelo de mesa portátil com iluminação. A autólise de leveduras é destacada pelo seu papel na produção de extratos ricos em nutrientes, enquanto a exploração de efluentes agroindustriais propõe uma solução para o descarte inadequado de resíduos e os altos custos de produção de microalgas, simultaneamente impulsionando a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos de alto valor agregado. As condições ótimas para a autólise de leveduras foram investigadas, chegando em mais de 80 % de eficiência na recuperação de proteínas, caracterizando uma alta taxa de lise celular, uma estratégia promissora para processos industriais mais sustentáveis. A fermentação de *Schizochytrium limacinum* em condições aprimoradas destaca-se pela eficiência na conversão de glicerol em biomassa e lipídios, onde foi obtido 40% desta biomolécula quando realizada fermentação em biorreatores utilizando resíduos agroindustriais e da produção de biodiesel, possibilitando a produção de valiosos bioprodutos. O desenvolvimento de um modelo de mesa portátil para o cultivo de microorganismos fotossintetizantes ilustra o potencial da inovação no design para facilitar a bioprodução, o modelo de utilidade foi validado com a realização de cinética de crescimento de *Spirulina* sp., a qual obteve a concentração máxima de células de superior a 4 g.L⁻¹, quando utilizada iluminação fornecida pela inovação. Juntas, estas investigações fornecem insights valiosos para o avanço de processos industriais sustentáveis, sublinhando a importância da biotecnologia na solução de problemas ambientais e no desenvolvimento de produtos econômicos e sustentáveis.

Palavras-chave: Autólise; Microalgas; Ômega 3 *Schizochytrium limacinum*; Sustentabilidade.

ABSTRACT

This work addresses the concept of a circular economy, involving various bioprocesses, from yeast autolysis—a key process for biotechnology and the food and pharmaceutical industries—to the use of agro-industrial effluents as substrates for microalgae cultivation, and the fermentation of *Schizochytrium limacinum* for the production of DHA and lipids, concluding with the innovation of a portable table model with lighting. Yeast autolysis is highlighted for its role in the production of nutrient-rich extracts, while the exploration of agro-industrial effluents proposes a solution for the improper disposal of waste and the high production costs of microalgae, simultaneously boosting the production of biofuels and other high-value bioproducts. Optimal conditions for yeast autolysis were investigated, achieving over 80% efficiency in protein recovery, indicating a high cell lysis rate, a promising strategy for more sustainable industrial processes. The fermentation of *Schizochytrium limacinum* under optimized conditions stands out for its efficiency in converting glycerol into biomass and lipids, with 40% of this biomolecule obtained when fermentation was carried out in bioreactors using agro-industrial and biodiesel production residues, enabling the production of valuable bioproducts. The development of a portable table model for the cultivation of photosynthetic microorganisms illustrates the potential of design innovation to facilitate bioproduction. The utility model was validated by conducting growth kinetics of *Spirulina* sp., which achieved a maximum cell concentration of over 4 g.L⁻¹ when using lighting provided by the innovation. Together, these investigations provide valuable insights for advancing sustainable industrial processes, emphasizing the importance of biotechnology in solving environmental problems and developing economical and sustainable products.

Keywords: Autolysis; Microalgae; Omega 3 *Schizochytrium limacinum*; Sustainability.

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Quantitative meta-research of different yeast autolysis methods	53
Tabela 2 - Características físico-químicas de alguns efluentes.....	64
Tabela 3 - Conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas.....	68
Tabela 4 - Variável resposta organização do planejamento experimental	88
Tabela 5 - Fatores codificados e não codificados para o planejamento experimental ...	89
Tabela 6 - Tabela de experimentos do planejamento experimental	89
Tabela 7 – Rendimentos (%) obtidos na autólise de levedura proveniente da fabricação de cerveja	93
Tabela 8 – Rendimentos (%) obtidos na autólise de levedura proveniente da fermentação de cana de açúcar	96
Tabela 9 - Testes preliminares dos resíduos	101
Tabela 10 - Ensaio do planejamento DCCR.....	102
Tabela 11 - Equações para os cálculos dos parâmetros cinéticos de crescimento no reator.	105
Tabela 12 - Resultados dos testes preliminares, concentração de biomassa e teor de lipídios	107
Tabela 13 - Resultados em relação ao teor de lipídios e concentração de biomassa no DCCR com glicerol padrão.....	109
Tabela 14 - Resultados em relação ao teor de lipídios e concentração de biomassa no DCCR com glicerol bruto.....	111
Tabela 15 - ANOVA do DCCR com glicerol bruto.....	113
Tabela 16 - Parâmetros cinéticos avaliados no cultivo em reator.	115
Tabela 17 - Parâmetros cinéticos avaliados durante o experimento com <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microfotografia da cianobactéria <i>Spirulina platensis</i> (aumento de 400x) ...	20
Figura 2 - Microfotografia da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
Figura 3 - Bioprodutos potenciais a partir das microalgas.	77
Figura 4 - Processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (CHISTI, 2007; YEN et al., 2013)	79
Figura 5 - (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017; LAKATOS et al., 2019).....	81
Figura 6 - Processo de produção de Digestão Anaeróbica utilizando biomassa algal (DE FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016; JAMBO et al., 2016; ZABED et al., 2020)	82
Figura 7 - Superfície de respota do DCCR com glicerol bruto	113
Figura 8 - Diagrama de pareto para o DCCR com glicerol bruto.	114
Figura 9 - Curva de consumo de substrato em relação ao crescimento de biomassa, no reator com aeração pneumática.....	117
Figura 10 - Curva de consumo de substrato em relação à produção de lipídios, no reator com aeração pneumática	119
Figura 11 - Curva de consumo de substrato em relação ao crescimento de biomassa, no reator com aeração mecânica	120
Figura 12 - Curva de consumo de substrato em relação à produção de lipídios, no reator com aeração mecânica	122
Figura 13 - Produção de ômega 3 nos reatores com agitações pneumática e mecânica	123
Figura 14 - Mudança visual dos reatores durante o processo.	124

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
CAPÍTULO II.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 ECONOMIA CIRCULAR	16
3.1.1 Aplicação na biotecnologia.....	17
3.2 TRAUSTOQUÍTRIDOS	18
3.3 MICROALGAS.....	19
3.3.1 Cianobactérias.....	20
3.3.2 Microalgas eucariontes	21
3.4 LEVEDURAS	23
3.5 UTILIZAÇÃO DE AUTOLISADO EM CULTIVOS	24
3.6 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS NO CULTIVO DE MICROORGANISMOS	25
CAPÍTULO III.....	27
Review 1: “Yeast autolysis – an essential step in adding value to by-product biomass”	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUCTION.....	30
2. Mechanisms for yeast autolysis.....	31
2.1 Yeast Cell Structure and Composition	31
2.2 Fermentation Parameters Affecting Yeast Cells	32
2.3 Cell Disruption Mechanisms	33
2.4 Economics of Cell Disruption Processes.....	33
2.5 Why Autolysis is Used?	33
3. YEAST AUTOLYSIS	34
3.1 Yeast Autolysis: Mechanisms and Molecular Insights.....	34
3.2 Mechanisms of Yeast Autolysis	35
3.3 Lytic Enzymes and Their Release	36

3.4 Environmental Signals Triggering Autolysis	38
3.5 Omics Descriptions of Autolysis Cascades	39
3.6 Effects of specific parameters.....	41
3.6.1 Temperature	41
3.6.2 pH	42
3.6.3 Salinity	44
3.6.4 Time	45
3.6.5 Aeration	46
3.6.6 Cell Age	47
3.6.7 Culture History	48
3.6.8 Use of Chemical Aids	50
4. RESPONSE VARIABLES OF AUTOLYSIS EFFICIENCY	51
5. QUANTITATIVE META-RESEARCH.....	52
6. DISRUPTED CELLS FRACTIONATION OVERVIEW OF POST DISRUPTION STEPS	57
7. TRENDS AND CHALLENGES.....	58
7.1 Trends in Yeast Autolysis.....	58
7.2 Challenges in Yeast Autolysis.....	59
8. CONCLUSIONS	60
Capítulo de livro: "Uso de resíduos líquidos agroindustriais para produção biocombustíveis a partir de biomassa microalgal".....	61
RESUMO.....	62
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. POTENCIAIS EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS.....	64
3. MICROALGAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS	67
3.1 Microalgas: fonte lipídios para a produção de biodiesel	67
3.2 Microalgas como fonte de carboidratos.....	70
4. SISTEMAS DE CULTIVO MICROALGAL.....	70
4.1 Condições que auxiliam na produtividade de lipídios.....	71
4.2 Condições que auxiliam na produtividade de hidrogênio.....	74
5. OBTENÇÃO DE BIOMOLÉCULAS COM USO DE RESÍDUOS LÍQUIDOS AGROINDUSTRIAIS	75

6. PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS COM EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS	79
6.1 Biodiesel a partir de microalgas	79
6.2 Produção de Hidrogênio com microalgas.....	80
6.3 Produção de bioetanol a partir de microalgas.....	81
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	84
8. CONCLUSÃO.....	84
Artigo 1: Strategic Parameter Optimization for Improved Outcomes in yeast autolysis.....	86
RESUMO.....	88
1. INTRODUÇÃO.....	88
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1 Planejamento Experimental	89
2.2 Fatores e Níveis	89
2.3 Preparação dos Cremes de Levedura	90
2.4 Processo de Autólise.....	91
2.5 Quantificação de Proteínas	91
3. RESULTADOS	92
3.1 Cerveja.....	92
3.2 Cana de açúcar.....	95
4. CONCLUSÃO.....	98
Artigo 2: "Sustainable Innovation: Omega-3 Production via <i>Schizochytrium Limacinum</i> Using Agro-Industrial and Biodiesel Production Residues.....	99
1. INTRODUÇÃO:	100
2. MATERIAIS E MÉTODOS	101
2.1 Seleção de cepas e preparo dos INÓCULOS.....	101
2.2 Otimização da produção em frascos ERLLENMEYER	101
2.3 PRODUÇÃO DE ÔMEGA-3 UTILIZANDO BIORREATOR STR 10L	103
2.4 Técnicas de separação e recuperação.....	104
2.4.1 Secagem em estufa.....	104
2.4.2 Técnicas de extração lipídica	104
2.5 Determinações quantitativas.....	105
2.5.1 Determinação de biomassa seca.....	105
2.5.2 Determinação do consumo de glicerol.....	106

2.5.3 Perfil dos ácidos graxos	106
2.6 Análise estatística	106
3. RESULTADOS	108
3.1 Testes preliminares	108
3.2 Planejamento experimental DCCR.....	109
3.3 Cinética em reator.....	116
4. CONCLUSÃO.....	126
CAPÍTULO IV.....	127
4 CONCLUSÃO GERAL.....	128
5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	129
CAPÍTULO V	131
6 REFERÊNCIAS.....	132

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A transição para práticas sustentáveis se tornou fundamental no atual contexto de desafios ambientais e econômicos, destacando a promoção da economia circular como essencial, particularmente para o setor de biodiesel e agroindústrias (DONNER; GOHIER; DE VRIES, 2020). O modelo econômico regenerativo da economia circular visa minimizar o desperdício enquanto maximiza o uso de recursos, transformando resíduos desses setores em recursos úteis, uma estratégia chave para mitigar impactos ambientais e fomentar a inovação (RODIAS et al., 2021). O desenvolvimento e a implementação de métodos biotecnológicos inovadores são determinantes para transformar esses resíduos em produtos de valor agregado, contribuindo assim para a sustentabilidade ambiental e eficiência econômica (USMANI et al., 2021). Dentro desse contexto, a autólise de leveduras emerge como um processo inovador chave, demonstrando como a valorização de biomassa residual pode revolucionar o gerenciamento de resíduos.

A autólise de leveduras desempenha um papel fundamental na valorização de biomassa residual, oferecendo uma inovadora revolução na gestão de resíduos por meio da transformação de subprodutos em componentes valiosos utilizáveis em uma variedade de setores (AHUJA et al., 2023). Esse processo não só facilita a reciclagem sustentável de materiais, mas também serve como um catalisador para a bioconversão eficiente, resultando na obtenção de ingredientes preciosos que atendem às demandas da indústria alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis (TAKALLOO et al., 2022). A eficácia desse método estabelece um vínculo direto entre a teoria da economia circular e sua aplicação prática, demonstrando como a inovação tecnológica pode ser aplicada para transformar desafios em oportunidades sustentáveis.

A exploração de culturas de microalgas enriquecidas por meio da autólise de leveduras, e também outros resíduos, explora novas oportunidades para a produção induzida de pigmentos e uma gama de compostos bioativos, incluindo ácidos graxos ômega-3 e carotenoides (SIVAKUMAR et al., 2022). Estes compostos são reconhecidos por suas valiosas aplicações e benefícios, abrangendo desde a nutrição humana e animal até aplicações terapêuticas e energéticas, refletindo um avanço significativo no aproveitamento de recursos biológicos para inovações sustentáveis (CICHONSKI; CHRZANOWSKI, 2022).

A técnica de cultivo de microorganismos, em particular *Schizochytrium limacinum*, aproveitando especificamente resíduos de produção agroindustrial e de biodiesel, tais como milhocina, creme de levedura e glicerol, como substratos, é uma estratégia inovadora que transcende o simples gerenciamento de resíduos (BOURAS et al., 2022). Essa metodologia não apenas enfrenta proativamente os desafios associados ao descarte de resíduos, mas também ressalta a capacidade transformadora desses subprodutos em recursos valiosos (TALBIERZ et al., 2022a). Ao reutilizar esses materiais como nutrientes para o crescimento microbiano, a abordagem enfatiza o potencial econômico e ambiental da conversão de tais subprodutos em compostos bioativos (OLIVER et al., 2022).

A estrutura da tese foi planejada para abordar o tema da inovação sustentável através da economia circular, com foco especial na autólise de leveduras e na valorização de resíduos agroindustriais. O desenvolvimento da tese é iniciado com uma revisão detalhada intitulada "Yeast autolysis – an essential step in adding value to by-product biomass", que estabelece o fundamento teórico e a importância de transformar biomassa residual em recursos valiosos. Segue-se um capítulo de livro dedicado ao "Uso de resíduos líquidos agroindustriais para produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal", expandindo o escopo da discussão para aplicativos específicos de resíduos líquidos no campo energético. O primeiro artigo, "Strategic Parameter Optimization for Improved Outcomes in yeast autolysis", apresenta uma análise sobre como otimizar processos para maximizar a eficiência da autólise de leveduras. Em seguida, o segundo artigo, "Sustainable Innovation: Omega-3 Production via *Schizochytrium Limacinum* Using Agro-Industrial and Biodiesel Production Residues", exemplifica uma aplicação prática da teoria, demonstrando como os resíduos podem ser transformados em produtos de alto valor, como os ácidos graxos ômega-3. Essa estrutura não apenas reflete uma abordagem compreensiva e multidisciplinar ao tema, mas também evidencia a progressão lógica do entendimento teórico para a aplicação prática, enfatizando a relevância da pesquisa para desafios ambientais e econômicos contemporâneos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e desenvolver estratégias inovadoras para promover a economia circular, focando na valorização de coprodutos de biodiesel e agroindustriais, através da otimização de processos biotecnológicos e do desenvolvimento de novos produtos, visando a sustentabilidade ambiental e a eficiência econômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a importância da autólise de leveduras como método chave para agregar valor à biomassa residual, identificando os mecanismos e os benefícios potenciais deste processo no contexto de uma economia circular.
2. Avaliar a eficácia e a viabilidade técnico-econômica da utilização de diferentes efluentes agroindustriais como substratos para o cultivo de microalgas específicas, com o propósito de otimizar a produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol e biohidrogênio).
3. Otimizar os parâmetros estratégicos envolvidos na autólise de levedura para maximizar a eficiência e o valor agregado dos subprodutos, contribuindo para processos mais sustentáveis e economicamente viáveis.
4. Explorar a viabilidade da produção de ácidos graxos ômega-3 utilizando *Schizochytrium limacinum* em substratos derivados de coprodutos agroindustriais e de produção de biodiesel, destacando as implicações para a saúde, nutrição e sustentabilidade ambiental.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ECONOMIA CIRCULAR

A economia circular emerge como um modelo regenerativo que visa reconfigurar o sistema econômico atual, centrando-se na sustentabilidade e na otimização da reutilização de recursos. Este modelo inovador procura não apenas reparar e renovar o que já existe, mas também revitalizar os recursos, transformando assim o ciclo de vida dos produtos. Ao fazer isso, assegura que os recursos sejam empregados de forma mais eficiente e sustentável, contrastando com o paradigma econômico linear tradicional, que segue o ciclo de extração, fabricação, consumo e descarte, frequentemente resultando em um uso insustentável de recursos e na geração de grandes quantidades de resíduos (JACOBS et al., 2022).

Em contrapartida ao modelo linear, a economia circular introduz um sistema onde os materiais e produtos são valorizados de forma contínua, promovendo a sua reutilização, reparo, remanufatura e reciclagem. Este sistema não apenas minimiza o desperdício, mas também estende a vida útil dos produtos e reduz o consumo de recursos primários. O design é central neste modelo, pois produtos e processos são concebidos desde o início para eliminar resíduos e evitar a poluição, um princípio que desafia a norma de tratar o lixo e a contaminação como externalidades pós-produção (CHUNG; PHUONG LE, 2023).

Adicionalmente, a economia circular se fundamenta em três princípios essenciais que guiam sua aplicação prática. Primeiro, ela enfatiza a eliminação de resíduos e poluição, instigando a criação de produtos que não gerem resíduos ou poluentes ao longo de sua vida. Em segundo lugar, foca em manter os produtos e materiais em uso pelo maior tempo possível, favorecendo assim a economia de recursos e a redução da necessidade de produção de novos bens (DOMENECH; BORRION, 2022). Isso é alcançado por meio de estratégias como reparo, remanufatura e reciclagem, que ajudam a criar um ciclo fechado para materiais. Por fim, o terceiro princípio busca regenerar sistemas naturais, uma abordagem que vai além de mitigar os impactos negativos, visando a restauração ativa e o enriquecimento dos ecossistemas (NASTARI; PISANO; POZZOLI, 2022).

3.1.1 Aplicação na biotecnologia

A integração da biotecnologia com os princípios da economia circular representa uma fronteira inovadora no desenvolvimento de produtos e processos sustentáveis. Esta sinergia desbloqueia potenciais para transformar setores inteiros, promovendo um uso mais eficiente dos recursos naturais e minimizando os impactos ambientais (SHELDON; BRADY, 2022). A biotecnologia, como um catalisador para a inovação, facilita a criação de soluções que estão em harmonia com os ideais de sustentabilidade, como é evidenciado na produção de bioplásticos e na conversão de resíduos orgânicos em bioenergia (ABINA et al., 2023; GARGALO et al., 2022). Estas aplicações não só ajudam a reduzir a dependência de recursos finitos, mas também apresentam uma abordagem pragmática para o gerenciamento de resíduos, transformando-os de potenciais poluentes em valiosos recursos energéticos (NCUBE et al., 2023).

A adoção de práticas biotecnológicas alinhadas à economia circular pode beneficiar uma ampla gama de setores (DAHIYA et al., 2022). Na agricultura, por exemplo, o uso de biofertilizantes derivados da biotecnologia pode melhorar significativamente a saúde do solo e a eficiência dos nutrientes, contribuindo para ciclos produtivos mais sustentáveis e diminuindo a dependência de insumos químicos sintéticos (SALINAS-VELANDIA et al., 2022). Isso não apenas realça a produtividade agrícola, mas também fortalece a resiliência dos sistemas agrícolas às mudanças climáticas e às pressões ambientais (REDDY et al., 2023).

Na indústria de manufatura, a biotecnologia pode revolucionar os processos produtivos, introduzindo métodos que geram menos resíduos ou que permitem a reciclagem de subprodutos. Tal inovação pode significar uma redução substancial na geração de resíduos industriais, contribuindo para ciclos de produção mais limpos e eficientes (DEVI, 2023). Ademais, no setor da moda, que historicamente tem sido associado a práticas insustentáveis, a biotecnologia oferece oportunidades para desenvolver materiais sustentáveis e métodos de produção que consomem menos recursos e reduzem o desperdício, alinhando a indústria com os princípios da sustentabilidade e responsabilidade ambiental (DAS et al., 2023).

A integração da economia circular na biotecnologia, especialmente através do uso de diversos microorganismos como microalgas, leveduras e traustóquitos, destaca um avanço promissor para a sustentabilidade ambiental e eficiência econômica. Estes organismos têm a capacidade de transformar resíduos agroindustriais e outros

subprodutos em recursos valiosos, como biocombustíveis, proteínas de alto valor e ácidos graxos ômega-3, alinhando-se com os princípios da economia circular de minimizar desperdícios e maximizar o uso de recursos. A utilização desses microorganismos em processos biotecnológicos não só oferece uma solução inovadora para o tratamento de resíduos, mas também abre caminhos para a produção sustentável de uma gama diversificada de produtos biotecnológicos. Assim, a economia circular na biotecnologia, com o auxílio destes microorganismos, representa um modelo eficaz para enfrentar desafios ambientais, promovendo ao mesmo tempo o desenvolvimento tecnológico e a sustentabilidade.

3.2 *TRAUSTOQUÍTRIDOS*

Os *traustoquítridos*, um grupo de microorganismos marinhos, desempenham um importante papel em ecossistemas aquáticos e são de grande interesse para diversas aplicações industriais e ambientais devido às suas notáveis características e funções. Esses organismos são reconhecidos principalmente por sua capacidade de sintetizar lipídios, especialmente o ácido docosahexaenoico (DHA), um ácido graxo ômega-3 de cadeia longa que é vital para diversas funções biológicas (LI et al., 2023).

A habilidade dos *traustoquítridos* de acumular grandes quantidades de lipídios, particularmente DHA, os torna extremamente valiosos. O DHA é um componente dos óleos de peixe e é essencial para o desenvolvimento cerebral, a manutenção da função cognitiva, a saúde ocular e a regulação do sistema cardiovascular (SONG et al., 2023). A capacidade desses microorganismos de produzir DHA de maneira sustentável apresenta uma alternativa viável aos óleos de peixe, cuja produção está associada a preocupações ecológicas e de sustentabilidade. Assim, os *Traustoquítridos* oferecem uma fonte promissora de ácidos graxos ômega-3, atendendo à crescente demanda por suplementos nutricionais e ingredientes funcionais que apoiam a saúde humana (SINGH et al., 2024).

Além de sua função na produção de lipídios, os *Traustoquítridos* desempenham um papel ecológico significativo na decomposição de detritos orgânicos nos oceanos. Eles estão envolvidos na quebra de matéria orgânica morta, transformando-a em nutrientes mais simples que podem ser reutilizados por outros organismos no ecossistema marinho (KALIYAMOORTHY et al., 2023). Esse processo de remineralização é fundamental para a manutenção da saúde dos ecossistemas aquáticos, pois facilita o ciclo de nutrientes e ajuda a sustentar a produtividade biológica. Através da decomposição de

detritos, estes microorganismos contribuem para o fluxo de energia nos ecossistemas marinhos e ajudam a manter o equilíbrio ecológico (ROBBINS et al., 2023).

No âmbito industrial e ambiental, os *Traustochytrids* têm aplicações notáveis. Sua capacidade de produzir biocombustíveis a partir de seus lipídios oferece uma alternativa renovável aos combustíveis fósseis, contribuindo para a mitigação das mudanças climáticas (BAI et al., 2022). Eles também são estudados por sua capacidade de degradar poluentes ambientais, como hidrocarbonetos e plásticos, o que os torna candidatos valiosos para estratégias de biorremediação. Essa habilidade de quebrar componentes poluentes pode ser crucial na limpeza de derramamentos de petróleo e na redução da poluição por plásticos nos oceanos, contribuindo para a proteção e a conservação dos ambientes marinhos (BALA et al., 2022).

3.3 MICROALGAS

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares, fotossintetizantes, que podem ser procarióticos ou eucarióticos, com a capacidade de formar colônias ou não. Sua fotossíntese contribui significativamente para a produção de oxigênio na atmosfera. A diversidade na composição da biomassa das microalgas, rica em carboidratos, proteínas, lipídios e pigmentos, permite sua aplicação em áreas como biofertilizantes, bioetanol, biopolímeros, suplementos alimentares e na indústria farmacêutica. Além disso, sua capacidade de biofixar dióxido de carbono ajuda na redução de gases de efeito estufa na atmosfera (ARUMUGAM, 2022; LIU; WEI; CHEN, 2022; SIDDIKI et al., 2022).

Habitando ambientes aquáticos variados, a coloração das microalgas depende dos pigmentos que possuem, o que influencia sua classificação baseada em habitat, pigmentos, produtos de reserva e constituição da parede celular (LOBUS et al., 2022). Elas são agrupadas em categorias como diatomáceas, algas verdes, algas verde-azuladas e algas douradas, cada qual com habitats e funções ecológicas específicas (NIERI et al., 2023).

Para seu crescimento, as microalgas necessitam de carbono, nitrogênio e fósforo, podendo ser cultivadas em ambientes naturais ou meios sintéticos, incluindo efluentes industriais e sistemas de tratamento de esgoto (FANKA et al., 2022). O cultivo pode ser feito em sistemas abertos, como lagoas naturais ou biorreatores abertos, que são economicamente vantajosos para produções em larga escala, apesar das limitações

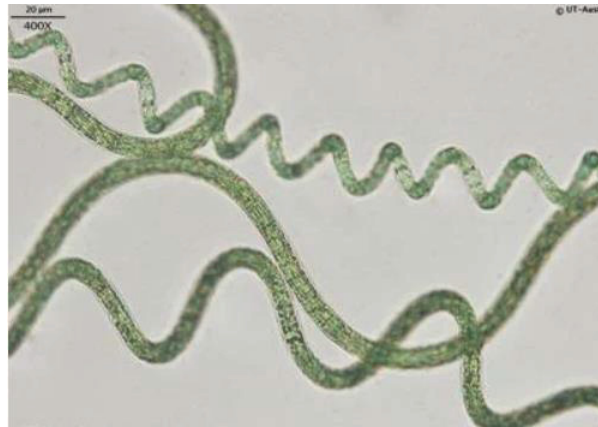
relacionadas a condições climáticas adversas e riscos de contaminação (XIANG, 2023). Os fotobiorreatores fechados, por outro lado, oferecem um ambiente controlado que minimiza contaminações, permitindo um controle mais preciso de parâmetros de cultivo e aumentando a produtividade de biomassa, embora representem maior custo inicial e operacional (AL-DAILAMI et al., 2022).

3.3.1 Cianobactérias

As microalgas procariontes, conhecidas como cianobactérias, são organismos unicelulares que realizam fotossíntese, desempenhando um papel essencial nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Diferentemente dos eucariontes, as cianobactérias não possuem núcleo delimitado por membrana nem organelas internas membranosas, como cloroplastos. Adaptadas a uma ampla variedade de ambientes, elas são capazes de viver em águas doces, salgadas e até em condições extremas, como fontes termais e desertos (RAI et al., 2022). As cianobactérias são essenciais para os ciclos biogeoquímicos, contribuindo significativamente para a fixação de nitrogênio e a produção de oxigênio. Além de seu papel ecológico, muitas cianobactérias são estudadas por suas potenciais aplicações em biotecnologia, incluindo a produção de biocombustíveis, bioprodutos e como fonte de nutrientes (RIGHINI et al., 2022).

Entre as cianobactérias, a *Spirulina*, tecnicamente conhecida como *Arthrospira*, destaca-se por seu valor nutricional excepcional e ampla aplicabilidade. *Spirulina* cresce em águas alcalinas e é amplamente cultivada em todo o mundo como suplemento alimentar, devido ao seu alto conteúdo de proteínas, vitaminas (especialmente do complexo B), minerais, ácidos graxos essenciais, clorofila e fitonutrientes (ZHANG et al., 2022). A estrutura celular simplificada da *Spirulina* facilita a digestibilidade, permitindo que seus nutrientes sejam facilmente absorvidos pelo corpo humano. Além de seus benefícios nutricionais, a *Spirulina* tem sido pesquisada por suas propriedades antioxidantes, imunomoduladoras e potencial antiviral, tornando-a um superalimento promissor para o fortalecimento da saúde humana.

Figura 1 - Microfotografia da cianobactéria *Spirulina platensis* (aumento de 400x)



Fonte: Culture Collection of Algae at University of Texas (UTEX) (2024).

A produção sustentável de *Spirulina* é um campo de interesse crescente, com sistemas de cultivo que vão desde abertos (*raceway*) até fotobiorreatores fechados, que permitem um controle mais preciso das condições de cultivo e maior produtividade (ZAREI et al., 2022). A otimização do cultivo deste microorganismo não só visa aumentar a eficiência da produção de biomassa e nutrientes, mas também reduzir o impacto ambiental, reciclando nutrientes e sequestrando CO₂. A *Spirulina* tem sido investigada também como potencial candidata para a biorremediação de águas residuais e como fonte de pigmentos naturais e antioxidantes (ORUGANTI et al., 2023). Com sua combinação de benefícios ambientais, nutricionais e de saúde, a *Spirulina* exemplifica o potencial das cianobactérias na biotecnologia verde e na promoção do bem-estar humano.

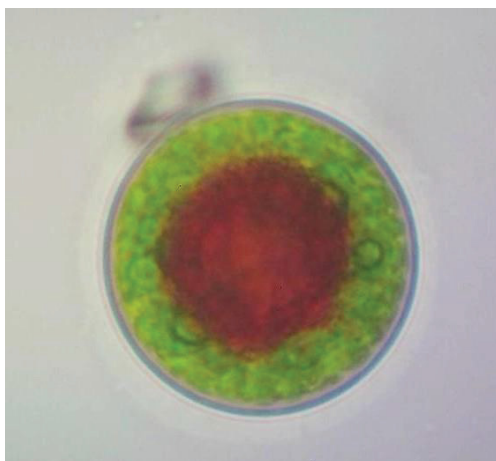
3.3.2 Microalgas eucariontes

As microalgas eucariontes representam um grupo diversificado de organismos aquáticos capazes de realizar fotossíntese, semelhante às plantas terrestres. Distintas de suas contrapartes procarióticas, como as cianobactérias, as microalgas eucariontes possuem células com núcleo verdadeiro e organelas membranosas, incluindo cloroplastos, onde ocorre a fotossíntese (GOMEZ-CASATI; BARCHIESI; BUSI, 2022). Este grupo abrange uma vasta gama de espécies, cada uma adaptada a nichos ecológicos específicos, variando de águas doces a salgadas, de ambientes temperados a tropicais. Devido à sua capacidade de crescer rapidamente e sua eficiência em capturar CO₂, as microalgas eucariontes têm sido exploradas em pesquisas relacionadas a biocombustíveis,

sequestro de carbono, nutrição humana e animal, e bioprodutos (MONTROYA-VALLEJO; GUZMÁN DUQUE; QUINTERO DÍAZ, 2023).

Dentre as microalgas eucariontes, a *Haematococcus pluvialis* se destaca por sua capacidade de produzir astaxantina, um pigmento vermelho considerado um dos antioxidantes mais potentes conhecidos. Este pigmento, que dá a *H. pluvialis* sua cor característica sob condições de estresse, como alta intensidade luminosa, falta de nutrientes ou elevada salinidade, tem várias aplicações industriais, principalmente como suplemento dietético para saúde humana e como aditivo em rações para peixes e aves, melhorando a cor da carne e do produto final (SONI et al., 2022). Budriesi et al. (2022) focaram nas propriedades antioxidantes da astaxantina extraída da *H. pluvialis*, investigando seus efeitos benéficos no trato gastrointestinal, destacando sua capacidade de estabelecer proteções eficazes contra o estresse oxidativo (BUDRIESI et al., 2022).

Figura 2 - Microfotografia da microalga *Haematococcus pluvialis*



Fonte: Laboratório de Engenharia de Microalgas - LEM (UFPR)

Oslan et al., 2022 discutem estratégias biotecnológicas para superar as limitações na produção de astaxantina a partir de *H. pluvialis*, focando na melhoria da eficiência do cultivo e rentabilidade, além dos efeitos de fatores de parâmetros associados ao cultivo de *H. pluvialis* sobre a bioprodução de biomassa e astaxantina (OSLAN et al., 2022). Além disso, estratégias para a ruptura celular eficiente são essenciais para a extração e purificação da astaxantina. Pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento de métodos de cultivo mais eficientes e sustentáveis, como fotobiorreatores fechados e sistemas de aquicultura integrados, que permitem o controle preciso das condições ambientais, maximizando a produção de biomassa e a concentração de astaxantina, ao mesmo tempo em que minimizam o impacto ambiental.

3.4 LEVEDURAS

Leveduras são fungos unicelulares que desempenham um papel fundamental em diversos processos biotecnológicos, industriais e de fermentação, graças à sua capacidade de converter açúcares em álcool e dióxido de carbono através do processo de fermentação. Estes micro-organismos são cultivados em uma variedade de meios de cultura, dependendo do objetivo específico, seja para produção de alimentos, bebidas, biocombustíveis ou produtos farmacêuticos (WATANABE, 2023). O cultivo de leveduras pode ser realizado em sistemas de fermentação em batelada, contínuos ou em batelada alimentada, com as condições ambientais, como temperatura, pH e aeração, cuidadosamente controladas para otimizar o crescimento e a produção desejada. Leveduras são utilizadas na fabricação de pão, cerveja, vinho e em bioprocessos para a produção de etanol, antibióticos, enzimas e suplementos nutricionais.

A *Phaffia rhodozyma* é uma espécie de levedura que se destaca pela sua capacidade de produzir astaxantina, um carotenoide de alto valor comercial, conhecido por suas propriedades antioxidantes e por ser um pigmento naturalmente vermelho (LAI et al., 2023). A astaxantina é amplamente utilizada na indústria de alimentos, especialmente em aquicultura, para pigmentar a carne de salmão, truta e camarão, melhorando seu valor de mercado e apelo ao consumidor (MUSSAGY et al., 2024). Além disso, devido às suas propriedades antioxidantes, a astaxantina é utilizada em suplementos dietéticos para promover a saúde humana, oferecendo benefícios como a melhoria da saúde da pele, redução do estresse oxidativo e suporte à função imunológica.

O cultivo de *Phaffia rhodozyma* exige condições específicas para maximizar a produção de astaxantina, incluindo controle rigoroso de nutrientes, temperatura, pH e intensidade de luz. Técnicas de engenharia genética e bioprocessamento avançado também têm sido aplicadas para aumentar os rendimentos de astaxantina e a eficiência do processo de cultivo (JIA et al., 2023). A pesquisa continua a explorar métodos de cultivo mais eficientes e sustentáveis, como o uso de resíduos agrícolas como substrato, visando reduzir os custos de produção e impacto ambiental (YANG et al., 2023). Esta levedura representa um excelente exemplo da aplicação de leveduras em biotecnologia, demonstrando o potencial de micro-organismos na produção de compostos valiosos para a indústria alimentícia, nutracêutica e aquicultura (LUNA-FLORES et al., 2023).

3.5 UTILIZAÇÃO DE AUTOLISADO EM CULTIVOS

O uso de levedura autolisada como substrato no cultivo de microalgas e leveduras é uma estratégia que reflete os princípios da biotecnologia circular e da sustentabilidade (OLIVEIRA et al., 2022). Extrato de levedura e paredes celulares de levedura desempenham um papel importante em diversas áreas, incluindo sua utilização como ingredientes em alimentos e rações. Os extratos de levedura constituem componentes vitais para meios de cultivo (GOYZUETA M. et al., 2020). A autólise, um processo pelo qual as células de levedura se degradam espontaneamente devido à ação de suas próprias enzimas, resulta em um produto rico em nutrientes, incluindo aminoácidos, peptídeos, vitaminas e minerais (LUTSENKO; SOPRUNOVA, 2022). Esses componentes são liberados no meio e podem ser utilizados como uma fonte de nutrição altamente eficaz para o crescimento de outros microrganismos, como microalgas e leveduras em cultivos subsequentes (CARBONE; MELKONIAN, 2023).

Na produção de microalgas, a adição de levedura autolisada pode melhorar significativamente a densidade celular e a taxa de crescimento, fornecendo nutrientes essenciais que são prontamente disponíveis para absorção pelas células de microalgas (KARITANI et al., 2023). Isso é particularmente útil em cultivos comerciais de microalgas, onde a maximização da eficiência e a redução de custos são cruciais. A levedura autolisada serve não apenas como uma fonte rica de nitrogênio e fósforo, mas também como um promotor de crescimento, devido à presença de vitaminas do complexo B e outros co-fatores metabólicos que são fundamentais para o metabolismo celular das microalgas (DE ANDRADE et al., 2022).

No cultivo de leveduras, a utilização de levedura autolisada como aditivo no meio de cultura pode promover uma melhoria na produção de biomassa e na atividade fermentativa. Este efeito é atribuído ao fornecimento de nutrientes solúveis e de fácil assimilação, que potencializam o metabolismo das leveduras ((AGBOOLA et al., 2022a). Esse método é especialmente vantajoso em processos industriais de fermentação, onde a eficiência da produção e a qualidade do produto final podem ser significativamente aprimoradas pela adição de um suplemento nutritivo rico e econômico como a levedura autolisada (TAKALLOO et al., 2020).

Além dos benefícios diretos para o crescimento e a produtividade, a utilização de levedura autolisada no cultivo de microalgas e leveduras reflete uma abordagem sustentável de produção. Ao reaproveitar subprodutos da indústria de fermentação,

minimiza-se o desperdício e promove-se a utilização eficiente de recursos (PARMAR et al., 2023). Isso não apenas reduz o impacto ambiental associado à produção de microrganismos, mas também contribui para a economia circular, maximizando o valor de subprodutos que, de outra forma, seriam descartados. Essas práticas estão alinhadas com os objetivos de desenvolvimento sustentável, demonstrando como inovações biotecnológicas podem facilitar processos mais verdes e eficientes na indústria (NASEEMA RASHEED et al., 2023).

3.6 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS NO CULTIVO DE MICROORGANISMOS

A problemática dos resíduos agroindustriais, particularmente a milhocina, o creme de levedura e o glicerol resultante da produção de biodiesel, representa um desafio significativo tanto para o meio ambiente quanto para a sustentabilidade dos setores agrícola e energético (VALLADARES-DIESTRA et al., 2023). Esses resíduos, se não gerenciados adequadamente, podem levar a uma série de problemas ambientais, incluindo a contaminação do solo e da água, além de contribuir para o aumento da emissão de gases de efeito estufa (MARTINEZ-BURGOS et al., 2021).

A milhocina, um subproduto do processamento do milho para produção de etanol, e o creme de levedura, oriundo dos processos fermentativos na indústria cervejeira ou de biocombustíveis, são ricos em matéria orgânica e nutrientes (SANTANA; MEIRELES, 2023). Contudo, seu descarte inadequado pode acarretar problemas ambientais significativos, como a poluição e o desperdício de potenciais recursos, visto que estes resíduos podem ser utilizados para obtenção de produtos de alto valor agregado (ELYAMNY et al., 2022). Da mesma forma, o glicerol, gerado em grandes quantidades como subproduto da fabricação de biodiesel, pode apresentar desafios em termos de descarte e tratamento, dada a sua demanda bioquímica de oxigênio elevada, podendo causar problemas em sistemas aquáticos se liberado sem tratamento adequado (DECARPIGNY et al., 2022).

Apesar desses desafios, esses resíduos agroindustriais possuem um potencial considerável para o cultivo de microrganismos, transformando um problema ambiental em uma oportunidade biotecnológica (PANTALEO MISSANA; MASHINGO; TUMBO, 2022). A milhocina e o creme de levedura podem ser utilizados como substratos para a produção de biomassa microbiana, enzimas, biopolímeros, ou mesmo compostos bioativos, devido à sua riqueza em nutrientes e compostos orgânicos (CHONGKHONG,

2024). O glicerol, por sua vez, pode ser empregado como fonte de carbono para o crescimento de diversos microorganismos, sendo particularmente valioso para a produção de bioprodutos, como biopolímeros, ácidos orgânicos e lipídios microbianos, incluindo biodiesel microbiano ((KARAYANNIS et al., 2023)2022).

O uso desses resíduos no cultivo de microorganismos não apenas contribui para a redução do impacto ambiental associado ao seu descarte, mas também promove a produção de energia renovável e produtos de valor agregado, alinhando-se com os princípios da economia circular. Além disso, a bioconversão desses substratos em produtos úteis pode oferecer soluções sustentáveis para a gestão de resíduos, enquanto simultaneamente gera inovações em bioprocessos e obtenção de bioprodutos de alto valor agregado.

CAPÍTULO III

Review 1:

“Yeast autolysis – an essential step in adding value to by-product biomass”

ABSTRACT

This review investigates yeast autolysis, an important biological process for biotechnology and the food and pharmaceutical industries. It elaborates on the mechanisms of autolysis, the spontaneous decomposition of yeast cells by its own enzymes, plays a crucial role in producing nutrient-rich yeast extracts used as flavor enhancers, in culture media, and as high-quality feed ingredients. However, despite being a well-known industrial practice, there is no consensus regarding autolysis conditions such as pH and temperature. Moreover, the significance of yeast cell walls, mainly comprised of beta-glucans and mannan-oligosaccharides, is analyzed, highlighting their applications as immune modulators in animal feed and for their health-promoting properties in the nutraceutical industry. The growth of the yeast fraction market, driven by the demand for natural and sustainable ingredients, is examined, along with the role of intellectual property in protecting and innovating processes and applications. The article aims to provide a comprehensive overview of yeast fraction technology, its market implications, and future directions, emphasizing the need for sustainable and innovative approaches to harness the potential of yeast fractions.

Keywords: Biotechnology; Bioprocess innovation; Sustainable ingredients; Yeast extracts.

1. INTRODUCTION

The biotechnological industry has witnessed significant growth over the past few decades, driven by advances in science and technology that have unlocked new possibilities for biological materials. Among these materials, yeast fractions have emerged as versatile and valuable products, finding applications across a range of sectors including food, feed, and pharmaceuticals (BEKATOROU; PSARIANOS; KOUTINAS, 2006; JENSEN; PATTERSON; YOON, 2008; RAWLING et al., 2023).

Yeast extract, a product derived from the cell contents of yeast, is widely used as a flavor enhancer in food products, a nutrient source in culture media, and a high-quality feed ingredient. Its unique composition, rich in vitamins, amino acids, and minerals, makes it an indispensable component in various industries (DE ISEPPI et al., 2019). On the other hand, yeast cell walls, comprised mainly of beta-glucans and mannan-oligosaccharides, have garnered attention for their application in animal feed as immune modulators and in the nutraceutical industry for their health-promoting properties (SHURSON, 2018).

The market volume and value of yeast fraction products have seen a steady increase, propelled by growing demand in the sectors of health, nutrition, and biotechnology. The expansion of this market is not only a testament to the product's versatility but also to the evolving needs of consumers and industries for sustainable and natural ingredients (DE SOUZA THEODORO et al., 2019). Major companies in the yeast fraction space, such as Lesaffre, Angel Yeast, and Lallemand, have been at the forefront of this growth, investing in research and development to innovate and expand their product offerings (RAKOWSKA et al., 2017).

Intellectual property (IP) within the realm of yeast fractions has evolved alongside market growth. The number of patents filed related to yeast extract and yeast cell wall applications has surged, reflecting the competitive landscape and the continuous search for improved processes and applications. This IP evolution underscores the significance of yeast fractions as a key area of innovation and the importance of securing proprietary technologies and applications (PÉREZ-TORRADO et al., 2015)

Market perspectives for yeast fractions are overwhelmingly positive, with anticipated growth driven by the increasing demand for natural and sustainable ingredients in food, feed, and health-related products. The processes used to produce yeast fractions are diverse, ranging from autolysis and hydrolysis to advanced biotechnological methods (NÚÑEZ et al., 2006). These processes are crucial in determining the quality, functionality, and application range of

the final product. The reason for reviewing these processes, market trends, and IP developments is twofold: to highlight the importance of yeast fractions in current biotechnological applications and to shed light on the multitude of alternatives proposed in both academic literature and patent documents (AMORIM et al., 2016). This review aims to provide a comprehensive overview of the current state of yeast fraction technology, its market implications, and future directions, emphasizing the need for sustainable, innovative, and efficient approaches in harnessing the potential of yeast fractions.

2. Mechanisms for yeast autolysis

2.1 Yeast Cell Structure and Composition

Yeast cells, as eukaryotic microorganisms, exhibit a complex internal structure that allows them to perform sophisticated biological processes. The outermost layer, the cell wall, is primarily composed of polysaccharides such as beta-glucans and mannans, which confer structural integrity and protection against osmotic stress and physical damage (FLEURI L. F.; SATO H. H., 2010). Beneath the cell wall lies the plasma membrane, a lipid bilayer that regulates the passage of ions and molecules in and out of the cell. The cytoplasm within contains various organelles, including the nucleus, which houses the cell's genetic material; mitochondria, the sites of cellular respiration; vacuoles, which are involved in storage and intracellular digestion; and the endoplasmic reticulum, which plays a role in protein synthesis and lipid metabolism. This intricate cellular architecture is essential for the yeast's survival, reproduction, and functionality in fermentation processes (LI; WANG; LI, 2015).

2.2 Fermentation Parameters Affecting Yeast Cells

The fermentation environment exerts a significant influence on yeast cell health and productivity. Temperature, for instance, affects yeast metabolism and growth rates; optimal temperatures promote efficient fermentation, while temperatures too high or too low can inhibit yeast activity or kill the cells. pH levels also play a critical role; most yeast strains prefer slightly acidic to neutral environments, and deviations can impact cell viability and fermentation efficiency. Osmotic pressure, determined by the concentration of sugars and other solutes, can cause water to flow out of yeast cells, leading to dehydration and reduced metabolic activity. Lastly, the accumulation of ethanol, a byproduct of fermentation, at high concentrations can be toxic to yeast cells, impacting their ability to survive and ferment

effectively (GNOINSKI et al., 2021).

2.3 Cell Disruption Mechanisms

Cell disruption techniques are pivotal for releasing valuable intracellular components from yeast cells for various applications. Chemical methods, such as using solvents or enzymes, can selectively permeabilize cell walls, enabling the extraction of specific compounds while minimizing damage to sensitive molecules (KOT et al., 2020). Physical methods, including sonication and freeze-thaw cycles, apply direct force to break cell walls, useful for extracting a broad range of cellular components but potentially damaging to proteins and nucleic acids. Mechanical methods, like bead milling or high-pressure homogenization, are highly efficient for disrupting cells and releasing their contents. However, they require significant energy input and can be costly in terms of equipment and operation (GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020).

2.4 Economics of Cell Disruption Processes

The economic considerations of cell disruption processes are crucial in industrial applications. The choice of disruption method affects not only the yield and purity of the desired product but also the overall cost-effectiveness of the production process. Mechanical and physical disruption methods, while efficient, involve high capital and operational costs due to the energy-intensive equipment required (QUESADA-SALAS et al., 2021). Chemical methods may offer lower upfront costs but can have implications for product safety and require further purification steps, potentially increasing downstream processing costs. The selection of a cell disruption method thus involves balancing the efficiency of cell lysis and product recovery against the associated costs and the quality requirements of the final product (TIMOTHEO et al., 2023).

2.5 Why Autolysis is Used?

Autolysis serves as a gentle, natural method for cell disruption, leveraging the yeast's own enzymes to break down cell components post-mortem. This process is particularly valued in the food and beverage industry, where it contributes to the development of flavor and texture in products like wine and beer (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021a). During autolysis, enzymes degrade the cell wall and internal structures, releasing amino acids, nucleotides, and other compounds that enhance product complexity and mouthfeel. Autolysis eliminates the need for harsh chemical or mechanical cell disruption methods, preserving the

integrity of flavor compounds and other sensitive molecules. Additionally, it offers an economically and environmentally sustainable option for cell disruption, requiring no external inputs beyond the initial cultivation of the yeast (TAKALLOO et al., 2022).

3. YEAST AUTOLYSIS

3.1 Yeast Autolysis: Mechanisms and Molecular Insights

Yeast autolysis is a self-degradation process whereby yeast cells break down their own components through the action of intracellular enzymes (ZHANG et al., 2021). This phenomenon is of considerable interest in various biotechnological fields, especially in the production of wine, beer, and other fermented beverages, where it plays a crucial role in flavor and aroma development (ROMANO et al., 2022). The mechanisms behind yeast autolysis are complex and multifaceted. As yeast cells reach the end of their life cycle or are subjected to stress conditions, such as nutrient depletion or high alcohol concentrations, they may enter an autolytic phase. During this phase, the integrity of the cell membrane deteriorates, allowing lytic enzymes, such as proteases and glucanases, to access and degrade the cellular components. These enzymes break down proteins, nucleic acids, lipids, and polysaccharides into smaller molecules (NAKATOGAWA; OHSUMI, 2020).

One of the molecular insights into yeast autolysis is the role of endogenous enzymes. Proteases degrade proteins into amino acids and peptides, which are then released into the surrounding medium. Glucanases break down glucans, which are components of the cell wall. The degradation of nucleic acids by nucleases also contributes to the pool of available nitrogen in the form of nucleotides and nucleosides (LINTON, 2020). In the context of alcoholic fermentation, such as in wine and beer making, these smaller molecules released during autolysis contribute significantly to the sensory profile of the final product. They can enhance the complexity, mouthfeel, and overall flavor profile. For instance, amino acids and peptides can contribute to umami and savory notes, while the breakdown of cell wall polysaccharides can affect the mouthfeel by increasing the sensation of fullness or viscosity (FRANCESCHI et al., 2023).

Moreover, the autolysis of yeast can release compounds that are precursors to aroma compounds. In winemaking, autolysis is a key factor in the development of the bouquet during the aging process, particularly in the method champenoise, where the prolonged contact with yeast lees results in the characteristic toasty, bready, and nutty flavors of sparkling wines (GNOINSKI et al., 2021).

The molecular pathways and regulatory networks governing yeast autolysis are still under investigation. Understanding these pathways is crucial for optimizing the process and potentially controlling the timing and extent of autolysis to tailor flavors and aromas. Advances in omics technologies, such as genomics, proteomics, and metabolomics, are facilitating a deeper understanding of the autolytic process (LESK; KONAGURTHU, 2021). These technologies allow researchers to monitor the changes in gene expression, protein profiles, and metabolite concentrations associated with autolysis, thus providing comprehensive insights into the molecular changes occurring within the yeast cells (LI et al., 2020b).

Yeast autolysis is not only important for its contributions to the sensory qualities of fermented beverages but also for its potential in waste management. Autolysed yeast can be a source of valuable nutrients and bioactive compounds, offering an environmentally friendly solution for the recycling of brewery and winery by-products. As research progresses, the expanding knowledge on the mechanisms and molecular details of yeast autolysis will continue to inform its applications in various biotechnological sectors.

3.2 Mechanisms of Yeast Autolysis

The mechanisms of yeast autolysis are a focal point of interest in the study of cellular biology and biotechnology due to their implications in various industries, notably in the fermentation sector. Yeast autolysis is a self-digestion process triggered under specific stress conditions or when the yeast cells reach the senescence phase of their life cycle (TAKAGI, 2021). The initiation of autolysis involves the compromise of the cell wall and membrane integrity, which are critical structural components of yeast cells. The cell wall is primarily composed of glucans and mannoproteins, and its degradation is a hallmark of autolysis. The cell membrane, on the other hand, is essential for maintaining cellular homeostasis and its disruption leads to a loss of cellular compartmentalization (CHEN et al., 2021).

Once the structural integrity of these barriers is compromised, a cascade of intracellular activities unfolds. Lytic enzymes that are normally contained within specific cellular compartments, such as vacuoles, are released into the cytoplasm. In a healthy cell, these enzymes are segregated to prevent inadvertent damage to cellular components; however, when autolysis is initiated, such segregation is lost (YIM; MIZUSHIMA, 2020). Proteases are among the primary enzymes that play a role in autolysis. They catalyze the hydrolysis of proteins into peptides and amino acids. This process not only recycles amino acids for other cellular processes but also contributes to the formation of flavor and aroma compounds in

fermented products. For instance, certain amino acids can be precursors to volatile compounds that are released during the maturation of beverages such as wine and beer (VINUTHNA; RAJU, 2022).

Nucleases, another group of enzymes involved in autolysis, are responsible for breaking down nucleic acids. The degradation of RNA and DNA by these enzymes generates nucleotides and nucleosides, which can be assimilated by other microorganisms or contribute to the nutritional value of yeast extracts (MAKINO et al., 2021). Glucanases target the structural polysaccharides in the yeast cell wall, namely glucans. The breakdown of these complex carbohydrates not only facilitates the release of other lytic enzymes but also contributes to the textural characteristics of fermented beverages. The released glucans can modify the mouthfeel of the product, adding to its viscosity and fullness (ZHANG et al., 2021).

The regulation of autolysis is not yet fully understood, but it is known to be influenced by both genetic and environmental factors. Various stress signals, such as high ethanol concentration, nutrient depletion, and temperature changes, can trigger the autolytic pathway (VOORDECKERS et al., 2020). Additionally, the expression levels of genes encoding lytic enzymes and the presence of specific metabolites can modulate the rate and extent of autolysis (ABE et al., 2021).

Understanding the mechanisms of yeast autolysis has significant practical implications. In industrial fermentations, controlling the autolytic process can optimize the sensory attributes of the final product. In the context of waste management, it can also provide a method for repurposing spent yeast cells, turning them into valuable sources of nutrients and bioactive compounds. As such, continued research into the molecular mechanisms and regulatory pathways of autolysis is critical for both the enhancement of fermentation processes and the development of sustainable waste utilization strategies.

3.3 Lytic Enzymes and Their Release

The consensus among researchers is that several lytic enzymes are indeed released during autolysis. Proteases degrade proteins into amino acids, nucleases break down nucleic acids into nucleotides, and glucanases dissolve cell wall glucans. The release of these enzymes is a tightly regulated process, influenced by the yeast's metabolic state and environmental conditions (DIMOPOULOS et al., 2018).

Lytic enzymes play a pivotal role in the process of yeast autolysis, and their release into the cell is a critical step in the degradation of cellular components. These enzymes are

typically stored in inactive forms or sequestered within specific compartments within the cell, such as lysosomes or vacuoles in eukaryotic cells like yeast (COMUZZO et al., 2015).

Proteases are one category of lytic enzymes involved in autolysis. These enzymes hydrolyze peptide bonds, leading to the breakdown of proteins into smaller peptides and free amino acids. These smaller molecules can then be either assimilated by other microorganisms in the environment or contribute to the sensory profile of fermented products. In the yeast cell, proteases are often regulated and activated in response to stress conditions or the initiation of programmed cell death pathways (TAKALLOO et al., 2020).

Nucleases are another group of lytic enzymes that are essential during autolysis. These enzymes catalyze the hydrolysis of the phosphodiester bonds within nucleic acids, breaking down DNA and RNA into their monomeric units, nucleotides, and nucleosides. These breakdown products can serve as a nitrogen source for other organisms or be utilized in various biochemical pathways.

Glucanases are responsible for the degradation of glucans, which are a major structural component of the yeast cell wall. The dissolution of glucans is a key aspect of autolysis, as it compromises the integrity of the cell wall, facilitating the release of other lytic enzymes and cellular contents. The action of glucanases is particularly relevant in the brewing and wine-making industries, where the remnants of the cell wall contribute to the mouthfeel and stability of the final product (WANG et al., 2018).

The release and activity of these enzymes are meticulously regulated by the cell's metabolic state and the external environment. Factors such as pH, temperature, osmotic stress, nutrient availability, and the presence of specific signaling molecules can all influence enzyme release. In healthy cells, mechanisms are in place to prevent unwanted cellular damage by these potent enzymes. However, under autolytic conditions, these control systems are overridden.

Stress responses, such as the unfolded protein response or the heat shock response, can upregulate the production of certain lytic enzymes, while other enzymes may be released as a result of organelle damage or through programmed pathways that lead to cell death. The mechanisms behind the controlled release of lytic enzymes are an active area of research, with significant interest in not only understanding the biology of yeast cells but also in leveraging these mechanisms for industrial applications (LI et al., 2020c).

In industrial processes, the controlled release of lytic enzymes is desirable as it can lead to the improved release of flavor and aroma compounds, enhancing product quality. Additionally, understanding how these enzymes are released and function can help in developing more efficient ways to process yeast biomass, creating value-added products such

as yeast extracts, which are used as flavor enhancers and nutrient supplements (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021b).

Overall, the study of lytic enzymes and their release during yeast autolysis continues to be a dynamic and significant field, with implications for our understanding of cellular biology and for the optimization of industrial fermentation processes.

3.4 Environmental Signals Triggering Autolysis

Autolysis can be triggered by a variety of environmental signals, including nutrient depletion, high ethanol concentrations, osmotic stress, and changes in temperature. These conditions signal the yeast that it is in a non-viable state, leading to the activation of autolytic pathways. The exact molecular mechanisms underlying the detection of these signals and the subsequent triggering of autolysis are complex and involve various signaling pathways, including those related to stress response and programmed cell death (LI et al., 2020c).

Yeasts, like all living organisms, require a range of nutrients for growth and reproduction, including sugars, amino acids, vitamins, and minerals. When these become scarce, the cell can no longer maintain its normal metabolic functions, leading to the initiation of autolysis. The scarcity of nutrients acts as a stress signal, indicating that the cell is in a non-viable state, unable to sustain active growth. This can trigger a series of metabolic changes that ultimately lead to the activation of autolytic pathways (AUESUKAREE, 2017).

In the context of alcohol fermentation, the accumulation of ethanol is a common environmental stress factor for yeast. High concentrations of ethanol can disrupt cellular processes, damage the integrity of the cell membrane, and denature proteins. This creates a toxic environment for the yeast, leading to the induction of autolytic processes as a form of programmed cell death or as a last-ditch effort to release nutrients for other cells (UDOM et al., 2019).

Yeast cells can experience osmotic stress when there are abrupt changes in the solute concentration of their environment. Such changes affect the osmotic balance across the cell membrane, potentially leading to cell shrinkage (hyperosmotic stress) or swelling and bursting (hypoosmotic stress). To counteract this, yeast may initiate autolysis, releasing enzymes that can adjust the osmotic balance by modifying internal solute concentrations (GOMAR-ALBA; MORCILLO-PARRA; DEL OLMO, 2015).

Extreme temperatures, both hot and cold, can induce stress responses in yeast. High temperatures can cause thermal stress, leading to protein denaturation and membrane fluidity

changes. Conversely, low temperatures may slow down metabolism and cause membrane rigidification. These temperature-induced stresses can signal the yeast cells to begin autolytic processes as a means to either recycle damaged components or as a programmed cell death mechanism (SAINI et al., 2018).

The molecular mechanisms that detect these environmental signals and trigger autolysis are mediated by complex signaling pathways. These pathways often involve sensors or receptors that detect specific stress signals, signaling molecules that transmit this information into the cell, and transcription factors that activate genes involved in the autolytic process (HEINISCH, 2020).

Stress response pathways, such as the MAP kinase pathways, are known to play a role in autolysis. These pathways can be activated by various types of environmental stress and lead to the expression of genes that promote cell survival or, in the case of overwhelming stress, autolysis. Programmed cell death pathways in yeast, analogous to apoptosis in multicellular organisms, can also lead to autolysis. These pathways are often regulated by a balance between pro-survival and pro-death signals within the cell. Under certain conditions, the scale tips towards autolysis, activating enzymes that dismantle the cell (MITCHELL; WEI; LIM, 2015).

Investigations into these pathways are ongoing, with research leveraging genetic, proteomic, and metabolomic approaches to unravel the intricate network of signals and cellular responses that culminate in yeast autolysis. A greater understanding of these processes not only informs basic yeast biology but also has practical implications for industries that rely on yeast fermentation, allowing for the fine-tuning of fermentation processes to enhance product quality and yield (ENE et al., 2015).

3.5 Omics Descriptions of Autolysis Cascades

Recent advances in omics technologies (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) have provided new insights into the autolysis process. These studies have identified specific genes, transcripts, proteins, and metabolites associated with autolysis, offering a more detailed understanding of the molecular cascades involved. For instance, transcriptomic analyses have revealed upregulation of genes encoding for lytic enzymes and stress response proteins during autolysis, indicating their direct involvement in the process. Proteomic studies have similarly identified a set of proteins whose expression levels significantly change during autolysis, providing clues to the biochemical pathways activated during cell death and degradation (LIU et al., 2019).

Genomic studies involve the analysis of the entire genetic makeup of an organism. In the context of yeast autolysis, genomics can help identify the genes that are inherently predisposed to influence autolytic pathways. By comparing the genomes of yeast strains with different autolytic rates, researchers can pinpoint genetic variations that correlate with autolytic tendencies, offering targets for genetic manipulation (DIMOPOULOS et al., 2018).

Transcriptomic analyses provide insights into the RNA transcripts present in yeast cells during autolysis, reflecting which genes are actively being transcribed. These studies have identified an upregulation of genes involved in the stress response, as well as genes encoding lytic enzymes such as proteases, nucleases, and glucanases. The increase in transcript levels for these genes suggests that the cell is gearing up to either combat the stress or initiate the autolytic process (KARCZEWSKI; SNYDER, 2018).

Proteomics involves the large-scale study of proteins, which are the functional molecules within cells. During autolysis, proteomic analyses have identified alterations in the abundance of various proteins. These include not only the enzymes directly responsible for the breakdown of cellular components but also proteins involved in signal transduction, cell structure, and energy metabolism. The presence and quantity of these proteins can indicate the cell's metabolic state and the progression of autolysis (COUVILLION et al., 2019).

Metabolomic studies focus on the small-molecule metabolites present within cells and biofluids. In yeast undergoing autolysis, metabolomics can reveal changes in the levels of specific metabolites that serve as substrates or products of enzymatic reactions. For example, an accumulation of certain amino acids might result from the action of proteases, whereas a decrease in nucleotide concentrations could indicate nuclease activity (TAKALLOO et al., 2020).

Combined, these omics approaches offer a comprehensive view of the autolysis cascades. By understanding which genes are turned on, which transcripts are produced, which proteins are synthesized and active, and which metabolites are consumed or released, researchers can construct a detailed map of the autolytic process. This map is invaluable for identifying potential biomarkers for autolysis, understanding the interplay between different cellular components during autolysis, and developing strategies to control or harness this process in industrial applications (JENDOUBI, 2021).

Furthermore, omics data can be integrated through systems biology approaches to create predictive models of autolysis. These models can help forecast how yeast cells will respond to different environmental conditions and guide the optimization of fermentation processes for improved flavors, aromas, and yields in various fermented products. As omics

technologies continue to advance, the depth and breadth of our understanding of autolysis are expected to expand, opening new avenues for research and application in the fermentation industry and beyond.

3.6 Effects of specific parameters

In the context of yeast autolysis, particularly within industrial applications like fermentation, brewing, and biotechnology, several nuanced factors beyond temperature, pH, salinity, time, and aeration can significantly influence the process. These include cell age, culture history (such as nutrient depletion or exposure to varying conditions), and the use of chemical aids (like solvents or enzymes). Additionally, the scope of autolysis, especially distinguishing between complete cell lysis and mere permeabilization of the cell wall for selective leakage of small molecules, is crucial for a precise understanding and application of autolytic processes (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021b).

3.6.1 Temperature

Temperature plays a significant role in yeast autolysis. Higher temperatures can accelerate the autolytic process by increasing the activity of lytic enzymes responsible for breaking down cell components. However, excessively high temperatures may lead to the denaturation of these enzymes, thereby inhibiting the autolysis process. Conversely, lower temperatures slow down enzymatic activity and autolysis, potentially leading to incomplete cell breakdown over the same duration. Optimal temperatures for autolysis vary depending on the yeast strain but generally fall within the moderate range that supports enzymatic activity without causing denaturation (LIP, et al., 2020).

Yeast cells contain various enzymes that are responsible for autolysis, including proteases, nucleases, and glucanases. These enzymes have specific temperature ranges at which they function optimally. Generally, a moderate increase in temperature can enhance the rate of enzymatic reactions, leading to a faster onset and progression of autolysis. This is because, within certain limits, higher temperatures increase the kinetic energy of molecules, leading to more frequent and effective collisions between enzymes and their substrates (SU et al., 2019).

While moderate temperatures can promote enzyme activity, there is a threshold above which enzymes begin to lose their three-dimensional structure—a process known as denaturation. Denatured enzymes are unable to bind to their substrates properly and, as a result,

lose their catalytic activity. This can effectively halt the autolytic process, even if the other conditions would normally induce autolysis (FUNDO et al., 2023).

Temperature also affects the fluidity of the yeast cell membrane. Higher temperatures tend to increase fluidity, which can impact membrane-bound enzymes and transport processes. This can influence the release of lytic enzymes from intracellular compartments into the cytoplasm, where they act on their substrates. Conversely, at lower temperatures, the membrane becomes more rigid, potentially restricting the mobility and release of these enzymes (NIKOO et al., 2021).

At lower temperatures, the autolytic process slows down, which can be desirable in certain food and beverage applications where the goal is to preserve the yeast and its flavor contributions for longer periods, as seen in some wine and beer aging processes. However, if autolysis is desired for the purpose of nutrient recycling or flavor development, maintaining the temperature within an optimal moderate range can ensure a controlled and complete breakdown of the cells (VELOSO et al., 2019).

The optimal temperature for yeast autolysis can vary significantly depending on the yeast strain and the specific application. There is no consensus within the scientific community about the optimal temperature, with estimates ranging from below 10 degrees Celsius to over 70 degrees Celsius (MARTÍNEZ et al., 2018; COMUZZO et al., 2017). For instance, wine yeasts used in the production of sparkling wines are often subjected to autolysis at cooler cellar temperatures to gradually develop the desired flavor profile. In contrast, higher temperatures might be used to accelerate autolysis when processing yeast biomass for the production of yeast extracts (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021b).

3.6.2 pH

The pH of the fermentation medium affects the ionization state of cellular and enzymatic components, thereby influencing autolysis. Enzymes involved in autolysis, like proteases and nucleases, have optimal pH ranges within which their activity is maximized. A highly acidic or alkaline environment can alter the structure of these enzymes, reducing their activity and thus the rate of autolysis. Maintaining the pH within a range that supports the activity of these lytic enzymes is crucial for efficient autolysis and the release of desired flavor and aroma compounds (CHEN, et al., 2017)

Enzymes such as proteases and nucleases, which play important roles in the autolysis of yeast, have specific pH ranges where their activity is optimal. These enzymes are sensitive

to the pH of their environment, which affects the ionization of their active sites as well as their substrate molecules. The correct ionization state is necessary for the proper binding of the substrate to the enzyme and for the catalytic activity to proceed. A deviation from the optimal pH can result in a significant reduction in enzyme efficiency, slowing down the autolytic process (VELOSO et al., 2019).

Beyond affecting enzymatic activity, pH extremes can lead to alterations in the three-dimensional structure of enzymes. Extremely acidic or alkaline conditions can cause denaturation, where enzymes lose their functional shape. This structural alteration not only inhibits the current enzymatic activity but can also lead to irreversible enzyme inactivation, thereby stalling the autolytic process (KARAMAN, 2021).

The pH of the medium can also impact the stability and permeability of the yeast cell membrane and wall. Certain pH levels may cause changes in the electrostatic interactions and hydrogen bonding that maintain the integrity of these structures. This can affect the release of lytic enzymes from within the cell and the accessibility of these enzymes to their substrates, both of which are critical for efficient autolysis (FUNDO et al., 2023).

The pH of the fermentation medium not only influences the rate and extent of autolysis but also affects the stability and solubility of flavor and aroma compounds released during the process. Some of these compounds may be more volatile or reactive at certain pH levels, which can alter the sensory profile of the final product (ZHENG et al., 2019). Studies have analyzed a wide pH range for yeast autolysis, from more acidic to more basic conditions. This variance is directly linked to the enzymes that act in the degradation of the cell wall, as well as to the substrate that produced the yeast. The effectiveness of these enzymes, and consequently the autolysis process, varies significantly with the pH level, highlighting the complex interplay between pH environment, enzymatic activity, and substrate characteristics in yeast autolysis (ALCAIDE-HIDALGO et al., 2007; SPRINGER-VERLAG; BREDDAM; BEENFELDT, 1991).

To ensure efficient autolysis and the desired modification of flavor and aroma profiles in fermented products, it is crucial to maintain the pH within a range that supports the activity of lytic enzymes. This involves monitoring and adjusting the pH of the fermentation medium, which can be achieved through the addition of acidifying or alkalizing agents or by controlling the fermentation process to naturally maintain the pH within the desired range (CHEN, et al., 2017).

3.6.3 Salinity

Salinity, or the concentration of salts in the fermentation medium, can impact yeast autolysis through osmotic stress. High salinity levels increase the osmotic pressure outside the yeast cells, potentially leading to dehydration and cell shrinkage, which may trigger autolysis as a stress response. However, excessive salinity can also inhibit the activity of lytic enzymes, similar to the effects of extreme pH levels, thereby slowing down the autolysis process. Optimal salinity levels thus need to be maintained to balance the stress-induced autolysis without inhibiting enzymatic activity (KOT et al., 2019).

High salinity levels in the fermentation medium increase the osmotic pressure outside the yeast cells. This osmotic imbalance forces water to move out of the cells in an attempt to equalize the concentration of solutes across the cell membrane, leading to dehydration and cell shrinkage. Such physical stress on the cells can initiate autolysis as part of a stress response mechanism. The cells may begin to break down their internal components, releasing enzymes and other cellular contents into the surrounding medium (ARIF et al., 2020).

While moderate salinity can stimulate autolysis through osmotic stress, excessively high concentrations of salts can have a detrimental effect on the activity of lytic enzymes. Salts can affect the structure and function of proteins, including enzymes, by altering their ionic interactions and potentially leading to denaturation or inactivation. This effect is somewhat analogous to the impact of extreme pH levels on enzyme activity, where both too high and too low salt concentrations can inhibit the enzymes responsible for breaking down cell components during autolysis (UDOM et al., 2019).

Finding the optimal salinity levels for yeast autolysis involves striking a balance. It is necessary to apply enough osmotic stress to initiate autolysis without reaching salinity levels that would inhibit the activity of lytic enzymes. This balance can vary depending on the yeast strain, the composition of the fermentation medium, and the desired outcome of the fermentation process (PARK et al., 2019).

The effect of salinity on autolysis has practical implications for the production of fermented products. For example, in the brewing and winemaking industries, salinity can influence not only the rate and extent of yeast autolysis but also the flavor and aroma profile of the final product. By carefully controlling salinity, producers can enhance the release of flavor and aroma compounds during autolysis, improving product quality (ARIF et al., 2020).

Some yeast strains have developed mechanisms to tolerate high salinity levels, such as the accumulation of compatible solutes (e.g., glycerol) within the cell to counteract osmotic

stress. Understanding and exploiting these adaptive mechanisms can be valuable in optimizing fermentation processes, especially in environments where salinity control is challenging (JU et al., 2021).

3.6.4 Time

The duration of the fermentation and aging process is directly correlated with the extent of autolysis. Over time, autolytic processes progressively break down yeast cells, releasing more of the intracellular components into the fermentation medium. This time-dependent release of compounds contributes to the complexity and depth of flavors and aromas in the final product. Extended aging times are often employed in wine and beer production to maximize the benefits of autolysis, although the optimal duration can vary depending on the specific goals of the fermentation process and the characteristics of the yeast strain used (GUERRINI et al., 2018).

Autolysis is a time-dependent process. Initially, after yeast cells die or reach the end of their life cycle, they remain relatively intact. However, as time progresses, the autolytic process gradually breaks down the cellular structures, leading to the release of intracellular components into the surrounding medium. This includes enzymes, amino acids, nucleotides, lipids, and other compounds that can significantly contribute to the flavor, aroma, and mouthfeel of the final product (LAO et al., 2020).

The slow and gradual release of compounds during autolysis contributes to the complexity, depth, and richness of flavors and aromas in fermented beverages. For instance, in wine production, the extended contact with yeast lees (the sediment that forms at the bottom of the fermentation vessel) during aging allows for a continuous release of these compounds, enhancing the sensory profile of the wine. Similarly, in certain beer styles, such as bottle-conditioned ales, extended aging allows for the development of unique flavor profiles attributed to autolysis (WANG et al., 2020).

The optimal duration for aging to maximize the benefits of autolysis varies significantly depending on several factors, including the type of beverage being produced, the specific goals of the fermentation process, and the characteristics of the yeast strain used. In some cases, such as with certain wines or high-end beers, the product may be aged for months or even years to achieve the desired flavor and aroma complexity. Conversely, for products where fresh, crisp flavors are desired, extended aging and autolysis may be minimized (ELHALIS et al., 2021).

Different yeast strains have varying capacities for autolysis, influenced by their genetic makeup and the conditions of the fermentation process. Some strains may autolyze more readily, releasing a desired profile of compounds into the beverage within a shorter time frame, while others may require longer aging periods to achieve similar results (HU et al., 2018).

While extended aging can enhance the sensory qualities of a beverage through autolysis, there is a balance to be struck. Excessive aging can lead to over-extraction of certain compounds, potentially resulting in off-flavors or undesirable characteristics. Therefore, monitoring and controlling the duration of the aging process is crucial to optimize the benefits of autolysis without compromising the quality of the final product (GUERRINI et al., 2018).

3.6.5 Aeration

Aeration, or the introduction of oxygen into the fermentation medium, influences yeast metabolism and can indirectly affect autolysis. During aerobic conditions, yeast cells prioritize growth and reproduction, potentially delaying the onset of autolysis. In contrast, anaerobic conditions or limited aeration can lead to stress responses that may accelerate autolysis, as the cells shift towards survival mechanisms, including the self-digestion of intracellular components for nutrient recycling. The level of aeration must therefore be carefully controlled to balance yeast growth and metabolic activity with the desired rate of autolysis for flavor development (CANONICO et al., 2019).

Yeast cells can metabolize sugars anaerobically (without oxygen) to produce alcohol and carbon dioxide, a process central to the production of alcoholic beverages. However, in the presence of oxygen (aerobic conditions), yeast tends to prioritize oxidative metabolism, which leads to cell growth and reproduction rather than alcohol production. Aeration at the early stages of fermentation can, therefore, enhance yeast biomass but may delay the onset of autolysis since the cells are in a growth phase and not undergoing self-digestion (SRIPUTORN et al., 2020).

Limited aeration or anaerobic conditions can induce stress responses in yeast cells. Under such conditions, the cells might exhaust their nutrient reserves more quickly, leading to a premature entry into the stationary phase of growth and an earlier initiation of autolysis. The stress induced by oxygen limitation can trigger the yeast to engage in survival mechanisms, including autolysis, to recycle nutrients from dead or dying cells to support the remaining population (YAN et al., 2020).

The level of aeration during fermentation must be carefully managed to strike a balance between yeast growth and the desired rate of autolysis. In the production of certain wines and beers, controlled aeration might be applied to promote yeast health and vigor at the start of fermentation, ensuring a robust fermentation process. Subsequently, reducing aeration can help encourage autolysis, leading to the release of flavor and aroma compounds that contribute to the complexity of the final product (ARBTER et al., 2019).

Autolysis releases a range of compounds, including amino acids, peptides, nucleotides, and other cell constituents, into the fermentation medium. These compounds can significantly impact the flavor and aroma profile of fermented beverages. Controlled aeration, by influencing the timing and extent of autolysis, can therefore be a crucial tool in shaping the sensory characteristics of the final product (TRONCHONI et al., 2018).

The application and control of aeration vary across different fermentation practices. For instance, in winemaking, especially for sparkling wines, autolysis of yeast lees is a critical process for flavor development, and aeration is generally minimized after the initial growth phase to promote autolysis. In contrast, certain beer fermentation practices might employ aeration more strategically to manage yeast health and control the fermentation dynamics (DIMOPOULOS et al., 2018).

3.6.6 Cell Age

The age of yeast cells can significantly affect autolysis rates and efficiencies. Older yeast cells, which have gone through more reproductive cycles, generally have thicker cell walls and may accumulate mutations that affect cell wall integrity and enzyme activity. These factors can make older cells more susceptible to autolysis under stress or when enzymatic activities are triggered, contributing to the complexity of flavors in fermented products or affecting yield in biotechnological applications (WANG et al., 2018).

As yeast cells age and undergo multiple rounds of reproduction, changes occur in their cell wall structure. Older cells often have thicker cell walls, which is a response to the cumulative stress and damage they experience over their lifecycle. While this can be a protective adaptation, it also affects the process of autolysis. Thicker cell walls may initially act as a barrier to the release of intracellular components. However, once autolysis is initiated, these older cells may break down more completely due to their compromised structural integrity, releasing a rich array of compounds into the fermentation medium (LIU et al., 2018).

With age, yeast cells can accumulate mutations that might affect various cellular functions, including those related to cell wall integrity and the production and activity of lytic enzymes. Such mutations can make older cells more prone to undergo autolysis as they may be less able to maintain cellular homeostasis under stress conditions. The increased susceptibility to autolysis among older yeast cells can be leveraged in fermented beverage production to enhance flavor complexity (WANG et al., 2019).

The activity of enzymes involved in autolysis, such as proteases, nucleases, and glucanases, can be influenced by the age of the yeast cell. Older cells, due to their accumulated stress and possible mutations, may exhibit altered enzyme activity profiles. This can lead to differences in the rate and extent of autolysis and the types of compounds released during the process (LI et al., 2020b).

The use of older yeast cells can contribute to the complexity of flavors and aromas in fermented products. During autolysis, older cells may release different proportions of amino acids, peptides, nucleotides, and other flavor-active compounds compared to younger cells. This can be particularly beneficial in the production of certain wines and beers, where the nuanced flavors and aromas derived from yeast autolysis are highly valued (LI et al., 2020a).

In biotechnological applications, such as the production of yeast extracts or the recycling of yeast biomass, the age of yeast cells can affect the yield and composition of the final product. Understanding how cell age influences autolysis can help optimize these processes, ensuring efficient breakdown of cells and the desired composition of the extract (LIU; WANG; WEBER, 2018).

3.6.7 Culture History

The history of yeast culture, including nutrient availability, exposure to stress conditions (like osmotic or oxidative stress), and previous fermentation cycles, also influences autolysis. Nutrient depletion, particularly of essential elements like nitrogen or trace minerals, can trigger stress responses in yeast, potentially leading to early onset of autolysis. Similarly, yeast cells conditioned to certain stressors may exhibit altered autolytic behavior, either through adaptation mechanisms that delay autolysis or through sensitization that accelerates the process (RIBEIRO; BOURBON-MELO; SÁ-CORREIA, 2022).

The nutrient profile to which yeast cells have been exposed throughout their life cycle significantly impacts their physiological state and readiness to enter autolysis. Nutrient depletion, particularly of essential elements such as nitrogen, phosphorus, and trace minerals,

can lead to a stress response that predisposes the cells to autolysis. For instance, a nitrogen deficiency can limit the synthesis of new proteins and nucleotides, triggering the cells to recycle these components from within, thereby initiating autolysis. Conversely, a history of ample nutrient availability may result in a yeast population with a lower immediate propensity for autolysis, as cells are less stressed and more metabolically robust (ELHALIS et al., 2021).

Yeast cultures that have been exposed to stress conditions, including osmotic stress (from high sugar or salt concentrations), oxidative stress (from reactive oxygen species), or thermal stress (from extreme temperatures), may undergo changes that affect their susceptibility to autolysis. These stressors can induce adaptive responses, where yeast cells enhance their stress tolerance mechanisms, potentially delaying the onset of autolysis in future stress encounters. Alternatively, repeated or severe stress exposures might weaken cell structures or deplete protective resources, making cells more prone to autolysis (SHEN et al., 2022).

Yeast cells that have undergone multiple fermentation cycles might exhibit different autolytic behaviors compared to freshly cultured cells. The repetitive cycle of growth, fermentation, and dormancy can lead to the accumulation of genetic mutations and physiological changes that influence cell integrity and enzyme activity related to autolysis. In some cases, this may sensitize cells to autolytic triggers, accelerating the process under stress or nutrient-depleted conditions. In other cases, yeast may develop mechanisms to delay autolysis, extending their viability in the fermentation medium (AGBOOLA et al., 2022b).

The historical conditions of the yeast culture can lead to the development of adaptation mechanisms that influence autolysis. For example, yeast cells adapted to regular osmotic stress might accumulate compatible solutes, such as glycerol, to protect against dehydration. Such adaptations can impact the timing and extent of autolysis, as cells might be better equipped to manage stress and maintain cellular integrity for longer periods (LO et al., 2021).

The autolytic behavior influenced by the culture history of yeast has direct implications for the production of fermented products. In wine, beer, and bread making, the onset and progression of autolysis affect the flavor, aroma, and texture of the final products. Understanding and manipulating the culture history can therefore be a strategy to optimize these sensory attributes, tailoring them to specific production goals (NIK et al., 2022).

3.6.8 Use of Chemical Aids

The use of chemical aids, such as solvents or enzymes, can facilitate or control the autolysis process. Enzymatic preparations that target specific cell wall components can promote autolysis by enhancing the permeability of the cell wall, allowing for controlled leakage of intracellular products. Similarly, solvents that disrupt lipid membranes can be used to selectively permeabilize cells, enabling the extraction of valuable metabolites without complete cell destruction. The strategic use of these aids can optimize yields and product quality in various industrial processes (TAKALLOO et al., 2020).

Enzymes that target cell wall components, such as glucanases and mannanases, can be particularly effective in promoting autolysis. By breaking down specific polysaccharides in the yeast cell wall, these enzymes increase the wall's permeability. This selective degradation facilitates a more controlled release of intracellular products, including proteins, nucleic acids, and metabolites, which can be valuable for flavor development in fermented products or for the extraction of specific biochemicals. The use of enzymatic aids allows for a targeted approach to autolysis, where the breakdown of cellular components can be optimized based on the desired outcome of the process (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021).

Chemical solvents, particularly those that disrupt lipid membranes, can also play a role in controlling autolysis. Agents such as detergents or organic solvents can selectively permeabilize yeast cell membranes, enhancing the release of intracellular contents without necessitating complete cell lysis. This approach is beneficial for extracting valuable metabolites from yeast cells while minimizing the release of unwanted cellular debris. The choice of solvent and its concentration must be carefully considered to balance the efficiency of extraction with the preservation of the integrity of specific cellular components (KARAMAN, 2021).

The strategic use of chemical aids in yeast autolysis can significantly optimize yields and improve the quality of the final product. In industrial fermentations, such as those used in the production of wine, beer, and bioactive extracts, controlling the extent and rate of autolysis can enhance the sensory properties of the product or increase the yield of targeted metabolites. By carefully selecting and applying enzymatic preparations and solvents, producers can tailor the autolytic process to meet specific production goals (DIMOPOULOS et al., 2018).

Beyond fermentation industries, the controlled autolysis of yeast cells has applications in biotechnology, pharmaceuticals, and nutraceuticals. For instance, the extraction of yeast beta-glucans, which have recognized health benefits, can be optimized through the use of

specific enzymatic aids that target the cell wall without compromising the integrity of the glucans themselves (TAKALLOO et al., 2022).

The use of chemical aids in yeast autolysis provides a powerful tool for enhancing the efficiency and selectivity of this process. Whether through the application of specific enzymes that target cell wall components or the use of solvents to permeabilize cell membranes, these strategies enable the controlled breakdown of yeast cells. This controlled approach to autolysis opens up new possibilities for optimizing product yields and quality across a range of industrial processes, from food and beverage production to the extraction of valuable biochemicals for various applications (WANG et al., 2018).

4. RESPONSE VARIABLES OF AUTOLYSIS EFFICIENCY

The efficiency of yeast autolysis, particularly in industrial and biotechnological applications, can be evaluated by several response variables. These variables not only provide insight into the extent and effectiveness of autolysis but also help in optimizing conditions for desired outcomes, whether in the production of food and beverages or in the extraction of valuable cellular components. The key response variables of autolysis efficiency include different aspects (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021).

One of the primary indicators of autolysis efficiency is the release of intracellular compounds into the surrounding medium. This can include amino acids, nucleotides, enzymes, and other metabolites. The concentration of these compounds can be quantitatively measured using various analytical techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry, or spectrophotometry. The release of specific compounds of interest, such as flavor precursors in fermented beverages or valuable enzymes in industrial processes, is particularly monitored (TAKALLOO et al., 2020).

The degree of cell wall degradation is a direct measure of autolysis and can be assessed through microscopic examination or biochemical assays that quantify cell wall components like glucans and mannans. Techniques such as flow cytometry or scanning electron microscopy (SEM) can provide visual and quantitative data on the structural changes in yeast cells undergoing autolysis (DIMOPOULOS; TSANTES; TAOUKIS, 2020).

The activity of lytic enzymes, including proteases, nucleases, and glucanases, serves as a crucial response variable for autolysis efficiency. Increases in these enzyme activities indicate active autolysis. Enzyme assays, often substrate-specific, can be used to measure the activity levels of these enzymes during the autolysis process (LI et al., 2020b).

Autolysis can lead to changes in the physical properties of the fermentation medium, such as viscosity, turbidity, and color. These changes result from the release of cellular contents and the breakdown of yeast cells. Monitoring these physical properties can provide indirect indicators of autolysis progress and efficiency (FUNDO et al., 2023).

In the context of food and beverage production, the sensory characteristics of the final product, including taste, aroma, and mouthfeel, are vital response variables for assessing autolysis efficiency. The development of desired sensory profiles often depends on the extent and nature of yeast autolysis, which can be evaluated through sensory analysis by trained panels or instrumental analysis that mimics sensory perceptions (WANG et al., 2018).

For industrial biotechnology applications, the yield and quality of the target product (e.g., bioactive compounds, enzymes, or metabolites extracted from yeast cells) are critical response variables. Efficient autolysis can enhance the recovery and purity of these products, impacting overall process economics and product viability (TAKALLOO et al., 2022).

Advancements in omics technologies allow for the monitoring of genetic and proteomic changes in yeast cells during autolysis, providing a molecular-level understanding of autolysis efficiency. Transcriptomic and proteomic analyses can identify genes and proteins that are upregulated or downregulated during autolysis, offering insights into the regulatory mechanisms and potential ways to enhance autolysis efficiency (LI et al., 2020).

5. QUANTITATIVE META-RESEARCH

In the realm of biotechnological research, the process of yeast autolysis stands as a critical area of study with wide-ranging implications for the food, beverage, and pharmaceutical industries. Given the importance of this biological phenomenon, a comprehensive meta-analysis was conducted, focusing on scientific articles that explore yeast autolysis. This meta-study encompasses a broad spectrum of yeast species, analyzing the outcomes of autolysis under diverse chemical and physical.

The basis of this research involves the aggregation and synthesis of data from numerous scientific publications. Each article included in the meta-analysis provides distinct insights into the autolytic process, highlighting how various experimental conditions impact yeast behavior and the resulting by-products of autolysis. The objective was to identify patterns and underlying principles that could be obscured within the confines of individual studies.

The results of this meticulous effort are compiled in the table provided below (Table 1). This detailed compilation categorizes the studies based on the yeast species investigated,

along with the specific chemical and physical conditions utilized. It also summarizes the key outcomes and findings from each article, offering a comprehensive overview of the current knowledge in the field.

Table 1 - Quantitative meta-research of different yeast autolysis methods

Year	Reference	Especie	Temp (°C)	pH	NaCl	Time (h)	Observation
2008	(BURATTINI et al., 2008)	<i>S. cerevisiae</i>					
2002	(DRISCOLL et al., 2002)	Brewer's yeast					
1991	(SPRINGER-VERLAG; BREDDAM; BEENFELDT, 1991)	bakery yeast		8.0	yes	8 a 10	
1979	(BĚHALOVÁ; BERAN, 1979)	bakery yeast					
1970	(PEPPLER H. J.; 1970)		45-50	5.5		24	
2017	(COMUZZO et al., 2017)	<i>S. bayanus</i>	70-75				
1985	(BABAYAN; BEZRUKOV, 1985)		45-60				
1986	(BĚHALOVÁ; BERAN, 1986)	<i>S. cerevisiae</i>	40	5.5		10	
1986	(BĚHALOVÁ; BERAN, 1986)	<i>S. cerevisiae</i>	52	5.5		7	
1986	(BĚHALOVÁ; BERAN, 1986)	<i>S. cerevisiae</i>	52	5.5	yes	6	
2017	(VIEIRA; MELO; FERREIRA, 2017)	<i>S. pastorianus</i>	36			6	
1993	(KOLLÁR; ŠTURDÍK; ŠABLATÚROVÁ, 1993)	<i>S. cerevisiae</i>			yes		
2020	(TAKALLOO et al., 2020)	<i>S. cerevisiae</i>	55	5.5		48	
2020	(TAKALLOO et al., 2020)	<i>S. cerevisiae</i>	55	5.5		48	
2020	(TAKALLOO et al., 2020)	<i>S. cerevisiae</i>	55	7.0		48	
2007	(ALCAIDE-HIDALGO et al., 2007)	<i>S. cerevisiae</i>	30	3.0			
1999	(LE FUR et al., 1999)	<i>S. cerevisiae</i>	40	3.0			

2000	(MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; POLO, 2000)	<i>S. bayanus</i>	30	3.0			
1995	(HERNAWAN; FLEET, 1995)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>		4.5		240	
2014	(XU; WANG; LI, 2014)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	11	5.5			
2007	(PALOMERO et al., 2007)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	30	3.5			
2003	(ZHAO; FLEET, 2003)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	30, 40, 50, 60			336	orbital shaker
2005	(ZHAO; FLEET, 2005)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	30 - 60	7.0		240 - 336	
2005	(ZHAO; FLEET, 2005)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	40	4.0 – 7.0		240 - 336	
2020	(DIMOPOULOS; TSANTES; TAOUKIS, 2020)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	52	5.5			
2021	(YANG et al., 2021)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	55	5.5			Electric field
2018	(DIMOPOULOS, Georgios et al., 2018)	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	52	5.5			Electric field
1994	(ORBAN et al., 1994)	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	40 - 60			24	

2001	(VASALLO et al., 2001)	<i>Kluyvermyces jkugilis</i>							4, 8, 12, 16 and 18	high-pressure homogenizer
2011	(BOONYEUN et al., 2011)		50	5.5				49		100 rpm
2010	(HUANG, 2010)		55	6 - 7				3		
2018	(MARTÍNEZ et al., 2018)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7 - 43	3.5 – 7.0						Electric field (6-25% ethanol)
2001	(BARRETTE; CHAMPAGNE; GOULET, 2001)	bakery yeast	48	4 – 5.5 – 7.0 – 8.5				24		ethyl acetate (1.5%) and 2% chitosan
2011	(MARTINS OLIVEIRA; DE; NETO, 2011)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55.2	5.1	9,8			24		
2011	(FERNÁNDEZ et al., 2011)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40					24		60 rpm
2001	(MARTÍNEZ-RODRIGUEZ; CARRASCOSA; POLO, 2001)	<i>S. cerevisiae</i>	30,8	3				216		100 rpm (+ salt)
2009	(TANGÜLER; ERTEN, 2009)	<i>S. cerevisiae</i>	45, 50, 55 e 60	6				8 - 72		
2020	(LI et al., 2020)	bakery yeast	57.5	5.5						
2017	(BERLOWSKA et al., 2017)	<i>S. cerevisiae</i>	55					48		112 rpm
2019	(BERTOLO et al., 2019)	Brewer's yeast	55		2			24		150 rpm (7% ethanol)

6. DISRUPTED CELLS FRACTIONATION OVERVIEW OF POST DISRUPTION STEPS

The process of yeast cell disruption is a critical step in the extraction of valuable components such as intracellular enzymes, nucleic acids, and other metabolites, as well as for the production of yeast extract and cell wall products like glucans. Following cell disruption, several post-disruption steps are essential for the separation, purification, and preparation of these components for various applications. This overview provides a step-by-step description of these processes, from the initial separation of debris and soluble fractions to the final drying of yeast extracts and cell wall fractions (GANEVA et al., 2020).

After yeast cells have been disrupted, the resulting mixture contains a variety of components, including cell wall debris, intact cells (if the disruption is not complete), soluble proteins, nucleic acids, and other intracellular metabolites. The first step in fractionation involves separating the soluble fraction from the cell debris and intact cells. This is typically achieved through centrifugation or filtration techniques, where the denser cell debris is pelleted or retained on a filter, while the soluble components remain in the supernatant or filtrate (JACOB; HUTZLER; METHNER, 2019).

The soluble fraction may contain salts and other small molecules that could interfere with downstream applications or analyses. Desalination, often performed using dialysis or gel filtration chromatography, removes these unwanted small molecules. Further fractionation steps can then be applied to separate specific components based on their size, charge, or affinity for certain ligands. Techniques such as ion exchange chromatography, size-exclusion chromatography, and affinity chromatography are commonly used for this purpose (ZAINUDDIN et al., 2021).

Yeast extract, consisting of the soluble components obtained from yeast cell disruption, is a valuable product used in food flavoring, culture media, and as a nutritional supplement. To stabilize the yeast extract for storage and use, it is typically dried using spray drying, freeze-drying, or vacuum drying techniques. Spray drying is commonly used for large-scale production due to its efficiency and cost-effectiveness, while freeze-drying is preferred when preserving the activity of sensitive components (PATEL et al., 2019).

The yeast cell wall is rich in β -glucans and mannans, which have applications in the food, feed, pharmaceutical, and cosmetic industries due to their immunomodulatory and

health-promoting properties. Fractionating the cell wall to isolate these components involves breaking down the cell wall debris into smaller fractions, often using enzymatic treatments that selectively degrade other cell wall components while leaving the glucans intact. The resulting glucan-rich fraction can then be purified further, if necessary, through additional filtration or chromatography steps (AVRAMIA; AMARIEI, 2022).

Similar to yeast extract, the purified yeast cell wall fractions, particularly β -glucans, need to be dried to ensure stability and ease of handling. The choice of drying method depends on the sensitivity of the components and the desired form of the final product. Freeze-drying is often preferred for high-purity glucan fractions intended for use in health supplements or pharmaceutical applications, as it best preserves the structural integrity and biological activity of the glucans (VAN DEN ABBEELE et al., 2020).

7. TRENDS AND CHALLENGES

The study and application of yeast autolysis in various industries, particularly in food and beverage production and biotechnology, have evolved significantly. However, this progress comes with its own set of trends and challenges that researchers and industry professionals continue to navigate. Understanding these dynamics is crucial for optimizing autolysis processes and leveraging their full potential.

7.1 Trends in Yeast Autolysis

- a) **Enhanced Flavor and Texture in Food and Beverages:** One of the most significant trends in the use of yeast autolysis is in enhancing the flavor, aroma, and texture of food and beverages, especially in wine and beer production. Autolysis releases amino acids, nucleotides, and other compounds that contribute to the richness and complexity of flavors and aromas. There's growing interest in optimizing autolysis conditions to maximize these sensory attributes.
- b) **Biotechnological Applications:** Beyond traditional food and beverage applications, there's a trend toward exploiting yeast autolysis in biotechnology for the efficient recovery of intracellular products such as enzymes, peptides, and nucleic acids. This approach offers a sustainable and cost-effective alternative to chemical and mechanical cell disruption methods.

- c) **Nutritional Supplements and Functional Foods:** The breakdown products of yeast autolysis, including beta-glucans and mannan-oligosaccharides, are recognized for their health benefits, such as immune system modulation and gut health improvement. This has led to increased interest in incorporating autolyzed yeast components into nutritional supplements and functional foods.
- d) **Advances in Process Monitoring and Control:** The integration of modern biotechnological tools and analytical techniques for monitoring and controlling autolysis processes in real-time is a growing trend. These technologies enable the precise adjustment of autolysis parameters to achieve desired outcomes more efficiently.

7.2 Challenges in Yeast Autolysis

- a) **Process Optimization:** One of the primary challenges is optimizing the conditions for autolysis (e.g., temperature, pH, time) to balance the release of desirable compounds while minimizing undesirable flavors or components. Achieving consistent results requires a deep understanding of the complex interplay between various factors influencing autolysis.
- b) **Scale-Up:** Translating autolysis processes from the laboratory scale to industrial scale presents challenges, including maintaining process consistency, managing costs, and ensuring product quality. Scaling up also requires robust process control and monitoring systems.
- c) **Product Recovery and Purification:** Following autolysis, the efficient recovery and purification of valuable components from the complex mixture of cell debris and soluble materials can be challenging. Developing cost-effective and scalable separation and purification techniques remains a significant focus for research and development.
- d) **Regulatory and Safety Considerations:** As the use of autolyzed yeast products expands, especially in food, beverage, and health product markets, navigating regulatory requirements and ensuring product safety and quality become increasingly important. Meeting these standards can pose challenges, particularly in diverse and evolving regulatory landscapes.
- e) **Environmental and Sustainability Concerns:** With growing awareness of environmental sustainability, there's a challenge in ensuring that yeast autolysis processes are

environmentally friendly and sustainable. This includes considerations for energy use, waste management, and the sourcing of raw materials.

8. CONCLUSIONS

In summary, understanding yeast autolysis is crucial for improving its use in biotechnology, as it's a key method for extracting valuable compounds from yeast, affecting the quality of fermented products. The study of autolysis mechanisms and lytic enzymes is essential for further discoveries in yeast biology and its applications in industry. Future research, especially with advanced omics technologies, will enhance our knowledge of autolysis, including how environmental factors trigger it. Optimizing factors like temperature, pH, and others is necessary for producing high-quality products that meet consumer and market needs. Advances in biotechnology will continue to reveal more about yeast autolysis, making it important for various industries. Monitoring and optimizing the autolysis process, along with improving post-disruption steps, are key for obtaining high-quality yeast products. As research progresses, focusing on new trends and challenges will be vital for advancing applications in food, beverage, biotechnology, and more. Innovations and research in this field will help fully utilize yeast autolysis for industrial uses.

Capítulo de livro:

"Uso de resíduos líquidos agroindustriais para produção biocombustíveis a partir de biomassa microalgal"

RESUMO

A elevada produção de efluentes agroindustriais pode ser considerado como problema ambiental, pois muitas vezes estes resíduos são descartados de forma inadequada, causando diferentes malefícios ao ecossistema. Entretanto os efluentes possuem elevadas concentrações de nutrientes que podem ser utilizados como substrato para o cultivo de microorganismos, como as microalgas. As microalgas são organismos fotossintéticos, responsáveis por grande parcela da produção de oxigênio atmosférico. Estes organismos são amplamente estudados, devido à elevada concentração de biomoléculas de interesse industrial e tecnológico, porém um dos fatores limitantes para produção em grande escala é o elevado custo com meios de cultivo. Desta forma, a utilização de efluentes agroindustriais como substrato para o crescimento microalgal pode auxiliar nas duas problemáticas citadas anteriormente. A obtenção de energia utilizando fontes renováveis é de extrema necessidade para evitar a escassez de diversas matrizes energéticas. Aliado a isso, tem-se a utilização de microalgas para produção de biocombustíveis, como o biodiesel, bioetanol e biohidrogênio. Em vista disso, o presente capítulo possui como objetivo uma breve revisão da bibliografia a respeito dos principais efluentes agroindustriais utilizados no cultivo microalgal, visando a obtenção de biocombustíveis.

1. INTRODUÇÃO

O setor industrial apresenta diversas problemáticas, entre elas pode-se citar a elevada geração de resíduos e a dificuldade de reutilização. Estes resíduos, quando dispostos de forma incorreta, podem gerar inúmeros problemas ambientais. Porém, grande parte destes resíduos possui potencial para diferentes bioprocessos, como para o cultivo de microalgas, visto que podem ser utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento destes microorganismos. A utilização de resíduos agroindustriais para cultivo microalgal é de grande interesse, pois auxilia na viabilização do processo em grande escala, pois uns dos aspectos limitantes para o crescimento microalgal é o elevado custo dos meios de cultivo sintéticos (ACIÉN; FERNÁNDEZ; MOLINA-GRIMA, 2013)

As microalgas, por sua vez, são responsáveis por grande parcela da produção de oxigênio atmosférico, por serem microorganismos fotossintéticos. A sua morfologia é variada, além disso, estes organismos podem ser procarióticos ou eucarióticos, microscópicos e unicelulares, formadores ou não de colônias (RICHMOND; HU, 2013). Estes organismos são encontrados em ambientes aquáticos diversos, como mares, lagos e rios. A coloração apresentada varia de acordo com os pigmentos encontrados em sua composição (LESSARD *et al.*, 2002). Para que possam ser classificadas, são avaliados diferentes aspectos morfológicos, habitat natural e presença de pigmentos (CHAKRABORTY *et al.*, 2014). A classificação é dada em: diatomáceas ou *Bacillariophyta*; algas verdes ou *Chlorophyceae*; algas verde azuladas ou *Cyanophyta*; algas douradas ou *Chrysophyceae* (KUNJAPUR; ELDRIDGE, 2010). A biomassa desses microorganismos é amplamente utilizada, pois possui em sua composição elevados teores de biomoléculas, como: carboidratos, proteínas, lipídios e pigmentos. A biomassa microalgal tem utilizada para produção de biofertilizantes (RENUKA *et al.*, 2018), bioetanol (CHISTI, 2007), biopolímeros (DELATTRE *et al.*, 2016), suplementação alimentar (LUCAS *et al.*, 2018), bem como insumo para indústria farmacêutica (MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

Diversos resíduos agroindustriais são produzidos no Brasil, em grande quantidade, como por exemplo, a vinhaça, manipueira, soro de leite, efluente de abatedouro, efluente de óleo de palma, efluente do processamento de vinho e cerveja e milhocina. A vinhaça, por sua vez, é residual do processo de destilação do caldo fermentado da cana de açúcar, contendo alto teor nutricional. Essa característica faz com que seja possível sua utilização como fonte

de nutrientes nos processos biotecnológicos de produção de microalgas (SANTANA *et al.*, 2017). A manipueira é um efluente obtido no processamento da mandioca e sua composição depende das condições climáticas e do solo. Entretanto, da mesma forma que a vinhaça, este resíduo apresenta uma composição nutricional predominantemente rica em fósforo e potássio, o que possibilita seu uso para crescimento de micro-organismos, como as microalgas (DE CARVALHO *et al.*, 2018; GOLLO *et al.*, 2016).

Em vista disso, o presente capítulo tem como objetivo uma breve revisão da bibliografia a respeito dos principais efluentes agroindustriais utilizados no cultivo microalgal, visando a obtenção de biocombustíveis como biodiesel, bioetanol e biohidrogênio.

2. POTENCIAIS EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

De forma geral os diferentes processos de transformação das matérias primas em produtos com algum valor agregado estão diretamente ligados com a geração de efluentes. Por exemplo, a produção de 1m³ de etanol gera em média 12-15 m³ de vinhaça (SYDNEY *et al.*, 2021), sendo cada ano gerado no mundo em torno de 1,6 bilhões de m³ de vinhaça (SYDNEY *et al.*, 2019). No caso, por exemplo, do processamento da mandioca para a produção de amido ou farinha gera em média 0,6 m³ de manipueira por cada tonelada processada de mandioca (MARTINEZ-BURGOS *et al.*, 2019), sendo este um efluente com características tóxicas por conter concentrações significativas de cianeto. Os processos de abatimento e benefício de animais são umas das agroindústrias mais questionadas pelos altos consumos de água e conseqüentemente os altos volumes de efluentes gerados. Assim, o abatimento de aves, bovinos e suínos geram em média 10 m³ (FAGNANI *et al.*, 2019), 9 m³ e 8,3 m³ (AZIZ *et al.*, 2019) de efluente por cada tonelada de carne, respectivamente. No ano de 2017 foram produzidas no mundo 330 milhões toneladas de carne (aves, suíno e bovino) e conseqüentemente gerados em torno de 3 bilhões de m³ de efluentes (AZIZ *et al.*, 2019).

Conforme apresentado na Tabela 2, de forma geral os efluentes contêm altas cargas orgânicas (medidas como demanda química de oxigênio-DQO), são fontes de macro nutrientes tais como: carbono, nitrogênio, fósforo e potássio e alguns micronutrientes como, por exemplo, Ca, Mg, Zn etc. Essas características físico-químicas lhe concedem um grande caráter poluidor, sendo esses efluentes um dos responsáveis pelo desenvolvimento de processos de eutrofização nos corpos de água. Além disso, algumas das águas residuais

contêm poluentes de natureza tóxica tais como alguns metais pesados e cianeto no caso da manipueira, o qual possui um amplo espectro de toxicidade (DE CARVALHO *et al.*, 2018).

Devido ao seu potencial poluidor e eutrofizante, estes precisam ser tratados antes de serem dispostos no ambiente. Contudo, os custos para tratamento das águas residuais são altos, sendo associados principalmente à necessidade de infraestrutura adequada e a sua manutenção, algumas matérias primas ou insumos como os floculantes, energia e algumas vezes carvão ativado (HOLKAR *et al.*, 2016). De fato (MOLINOS-SENANTE; HERNÁNDEZ-SANCHO; SALA-GARRIDO, 2010) acharam que o custo de tratamento das águas residuais está na faixa 0.1158€/ m³ e 0.7491€/m³.

- Tabela 2 - Características físico-químicas de alguns efluentes.

Efluentes	Características	Razão de geração	Referências
Vinhaça	Alta DQO (27,5-299 gO ₂ /L), pH ácido (3,25-4,97), fonte de macronutrientes (N, P, K) e micronutrientes (Fe, Zn, Mg), metais pesados (Cr, Cd, Ni, Cu, Mn).	12-15 m ³ /m ³ de etanol	(PARSAEE; KIANI DEH KIANI; KARIMI, 2019; SYDNEY <i>et al.</i> , 2021)
Manipueira	Alta DQO (5,9-60 gO ₂ /L), pH (4-6,8) fonte macronutrientes (N, K) e micronutrientes (Ca, Mg, Zn, Na), o efluente também contém quantidades significativas de cianeto.	0,3-0,6 m ³ / ton mandioca	(DE CARVALHO <i>et al.</i> , 2018; MARTINEZ-BURGOS <i>et al.</i> , 2020)
Efluente do processamento do óleo de palma	Alta DQO (8,0-100 gO ₂ /L), pH (3,4-5,2) fonte macro nutrientes (N, P, K), fonte micronutrientes (Mg, Ca). Contém grandes quantidades de óleo	3,75 m ³ POME/ tonelada óleo bruto de palma	(LAM; LEE, 2011; ROSA <i>et al.</i> , 2020)
Efluente de abatedouros	DQO (0,5-15 gO ₂ /L) pH (4,9-8,1) fonte de macronutrientes (N, P, K). Contém grandes quantidades de gordura	10 m ³ / ton frango 9 m ³ / ton bovino 8,3 m ³ / ton suínos	(BUSTILLO-LECOMPTE; MEHRVAR, 2015)
Soro de leite	Alta DQO (70-100 gO ₂ /L), pH (3,5-4,9), fonte macro e micronutrientes. Contém o 95% da lactose do leite e	0,9 m ³ soro/m ³ leite processada	(CARLINI; CASTELLUCCI; MONETI, 2015;

	altas concentrações de gordura, proteína e ácido láctico.		PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012)
Efluente processamento de leite	DQO (5-10 gO ₂ /L), pH (4,0-7,0), fonte de macro e micronutrientes. Contém óleo e gorduras	0,2 L efluente/L leite processada	(SIRIANUNTAPIBOON; JEEYACHOK; LARPLAI, 2005)
Coalhada de soja	Alta DQO (10-20 gO ₂ /L), pH (5,5), fonte de macro e micronutrientes. Contém altas concentrações de carboidratos	-	(KIM, M. S.; LEE; KIM, 2011; LI, S. <i>et al.</i> , 2019)
Efluente processamento de cerveja	Alta DQO (2-3,5 gO ₂ /L), pH altamente variável (3-12), fonte de macro nutrientes (N, P)	-	(ARANTES <i>et al.</i> , 2017)
Efluente processamento de vinho	Alta DQO (até 10- 86,1 gO ₂ /L), pH (2,9-3,4). Fonte de pigmentos tais como clorofila	-	(DÍEZ <i>et al.</i> , 2017)
Milhocina	Alta DQO (100-402 gO ₂ /L), pH (4,4), fonte significativa macro e micronutrientes. Contém grandes quantidades de aminoácidos, ácido láctico etc.	-	(KIM, S. <i>et al.</i> , 2020; MARTINEZ-BURGOS <i>et al.</i> , 2021)

Uma alternativa é o tratamento dos efluentes visando a valorização, isso é a geração de produtos de valor agregado. Os efluentes contêm nutrientes chaves para o crescimento microbiano (LI, S. *et al.*, 2019). O tratamento biológico de efluentes com microalgas é atraente e promissor, pois estas utilizam os compostos das águas residuais para o seu crescimento “biorremediação”, através do qual grande parte da carga orgânica (DQO, DBO₅), nutrientes (por exemplo, Nitrogênio, Potássio, Fósforo, etc.) e alguns poluentes dos efluentes são removidos, além de resultarem na produção de bioprodutos de valor agregado e de amplo uso na indústria (LI, S. *et al.*, 2019; LUTZU *et al.*, 2021). Assim, (DE CARVALHO *et al.*, 2018) citaram que as microalgas *Chlorella* e *Spirulina* cultivadas em manipueira podem remover até 92% da demanda biológica de oxigênio (DBO₅), alcançando concentrações de biomassa entre 2 e 4 g/L, as quais são comparáveis com as obtidas com meios sintéticos. (SANTANA *et al.*, 2017) mostraram que as microalgas *Micractinium* sp. e *Chlamydomonas biconvexa* apresentaram crescimento vigoroso e maior produção de

biomassa do que a obtida com o meio Basal Bold. Destaca-se que a biomassa possuía grandes quantidades de carboidratos, proteínas e pigmentos tais como clorofila e carotenos, que têm amplas aplicações industriais. Além disso, (RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014) encontraram que a microalga *Scenedesmus* sp. apresenta marcado crescimento em meios de cultura com até um 40% v/v de vinhaça.

3. MICROALGAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Uma solução para a problemática ambiental envolve o uso de energias renováveis, ou seja, aquelas energias que praticamente são inesgotáveis no tempo, além de ter um aproveitamento tecnicamente viável e ter um baixo ou nulo efeito poluente (AL-HAMAMRE *et al.*, 2017; SHUKLA; SUDHAKAR; BARENDAR, 2017; UYAR; BEŞIKCI, 2017). Uma alternativa para a produção desse tipo de biocombustíveis é o uso de microrganismos, por exemplo, microalgas (RASHID *et al.*, 2013b). Porém, os rendimentos obtidos até agora inviabilizam seu uso, sendo necessárias novas pesquisas para melhoramento dos processos.

3.1 Microalgas: fonte lipídios para a produção de biodiesel

Atualmente é necessária a geração de novas fontes de lipídios que não coloquem em risco a segurança alimentar do mundo (ACOSTA; CHAPARRO-GIRALDO, 2009; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; GONZÁLEZ MERINO; CASTAÑEDA ZAVALA, 2008; SUÁREZ; MARTÍN, 2010). Nesse sentido, é essencial pesquisar novas fontes de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos, tais como as microalgas (SHAHIDI; ZHONG, 2005). Existem muitas microalgas que são fontes de triacilglicerídeos que podem ser aproveitados na produção de biodiesel, além disso, as características desses ácidos graxos são similares aos presentes nas oleaginosas usadas na obtenção de biodiesel como, por exemplo, o óleo de soja e de colza (DERNER *et al.*, 2006). Algumas das vantagens com respeito aos lipídios obtidos de fontes vegetais são: facilidade de cultivar, taxa de crescimento e produtividade muito maiores comparados à silvicultura convencional, exigindo muito menos área do que outras matérias-primas de biodiesel agrícola. Portanto, a competição por solo arável é bastante reduzida (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). As culturas podem ser desenvolvidas em águas doces, salgadas e inclusive residuais, há baixas exigências nutricionais, taxas de crescimento elevada -- a duplicação da biomassa pode ser

feita em menos de 24 horas (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; DEMIRBAS, 2010; MENG *et al.*, 2009; TRINIDAD *et al.*, 2013). Conforme (GONZÁLEZ; VIATCHESLAV; ALEXANDER GUZMÁN, 2009) o rendimento de óleo das microalgas é muito mais elevado comparado com outras oleaginosas. Enquanto o rendimento para as microalgas fica entre 58,700 L Ha⁻¹ (30% óleo peso na biomassa) para as oleaginosas como palma, coco, pinhão manso (*jatropha*) e soja os rendimentos só estão ao redor de 5950, 2689, 1892, 445 L Há⁻¹, respectivamente (CHISTI, 2007).

O principal problema do biodiesel a partir de microalgas é o custo de obtenção, o qual pode ser melhorado aproveitando os subprodutos como glicerina, proteína das microalgas entre outros (TRINIDAD *et al.*, 2013). Outro problema associado com este tipo de óleos é alta viscosidade e baixa volatilidade, afetando diretamente a ignição e sua combustão completa (DEMIRBAS, 2009). Porém, o interesse na produção de biodiesel utilizando estes microrganismos está associado à alta composição de lipídios que contém algumas espécies e a facilidade para sintetizá-los (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; DEMIRBAS, 2010; TRINIDAD *et al.*, 2013). Estes microrganismos tem a capacidade de acumular entre 10-80% de lipídios ou mais (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; CHISTI, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009). No enquanto, para a produção de lipídios usando microalgas, têm que ser controladas variáveis que afetam significativamente o crescimento e o seu conteúdo lipídico. Estas variáveis são a composição do meio de cultura, pH, a intensidade luminosa, agitação, disponibilidade de oxigênio etc. (CHRISTENSON; SIMS, 2011; CORRÊA *et al.*, 2017). Alguns gêneros de microalgas usados na produção de lipídios são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas

Espécie	Conteúdo lipídico (% massa seca)	Referências
<i>Ankistrodesmus</i> sp	24.0-31.0	(MATA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0-75.0	
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6-39.8	
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0-63.0	(ILLMAN; SCRAGG;
<i>Chlorella minutissima</i>	57.0	SHALES, 2000)
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-55.2	(MIAO; WU, 2006)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	11.9-22	(SFORZA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-58.0	(MATA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0-51.1	
<i>Dunaliella salina</i>	6.0-25.0	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.0-71.0	
<i>Euglena gracilis</i>	14.0-22.0	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0-44.0	
<i>Monallanthus salina</i>	20.0-22.0	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.97-29.7	
<i>Nannochloropsis</i> sp	60.0	(RODOLFI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Nitzschia</i> sp	16.0-47.0	(MATA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0-65.0	
<i>Parietochoris incisa</i>	60.0	(SOLOVCHENKO <i>et al.</i> ,
		2008)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0-57.0	(MATA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0-67.0	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0-55.0	
<i>Scenedesmus rubescens</i>	73.0	(MATSUNAGA <i>et al.</i> , 2009)
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5-51.3	(MATA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Spirulina platensis</i>	4.0-16.6	
<i>Spirulina máxima</i>	4.0-9.0	
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5-23.0	

3.2 Microalgas como fonte de carboidratos

Algumas espécies de microalgas possuem grande quantidade de carboidratos, (açúcares fermentáveis), como polímero de reserva convertendo-as em candidatas perfeitas para a produção de biocombustíveis tais como bioetanol e biometano (ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017).

Microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Spirulina* podem conter até um 50% do peso seco de amido e glicogênio (SIRAJUNNISA; SURENDHIRAN, 2016) porém as concentrações dependem das condições de crescimento (temperatura, meio de cultura, pH) (VELAZQUEZ-LUCIO *et al.*, 2018). A triagem e seleção de cepas de microalgas é uma tarefa necessária antes de iniciar com os processos de produção.

4. SISTEMAS DE CULTIVO MICROALGAL

Um dos principais aspectos para o cultivo microalgal, é a demanda por nutrientes, em especial carbono, nitrogênio e fósforo. Desta forma, visando diminuir o custo de produção, estes organismos podem ser cultivadas, em seus ambientes naturais, em meios de cultivo quimicamente definidos, efluentes agroindustriais e sistemas de tratamento de esgoto (RUBIO; SOUZA; SMITH, 2002).

O cultivo de microalgas pode ser realizado em sistemas fechados ou abertos. Quando utilizado o sistema aberto, podem-se utilizar lagoas naturais ou biorreatores abertos, como o *Raceway*. Os cultivos em grande escala são realizados preferencialmente em sistemas abertos, pois apresentam menor gasto de construção e operação (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Porém, o aspecto limitante nesta forma de cultivo é o fato de ser restrito para algumas cepas microalgais, visto que algumas microalgas não possuem resistência à condições climáticas adversas, além disso, existe o risco de contaminação por fungos, bactérias e outras microalgas (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

O uso de biorreatores fechados, como os tubulares, fornecem um ambiente mais seguro em relação à contaminação, além de existir a possibilidade de maior controle das condições ótimas de crescimento destes micro-organismos, como pH, temperatura e agitação (TREDICI, 2010). Outra vantagem do uso de fotobiorreatores fechados é a maior produtividade de biomassa, devido aos aspectos citados anteriormente (POSTEN, 2009).

Entretanto o fator limitante do uso desta forma de cultivo é o elevado custo de construção e operação (BAHADAR; BILAL KHAN, 2013).

As condições de cultivo podem ser variadas de acordo com a necessidade de produção de alguma determinada biomolécula. Condições de estresse, como variação na composição de nutrientes, elevada amplitude térmica e diferentes intensidades luminosas, podem modificar o metabolismo microalgal para produção de biomoléculas reserva, como os carboidratos (SUBHASH et al., 2014). Porém, embora haja a redução excessiva destes compostos, a fotossíntese segue ocorrendo. Durante este processo, o carbono fixado pela fotossíntese é desviado da síntese proteica para vias de formação de carboidratos e lipídios (LI, Y. *et al.*, 2011).

Para a produção de biocombustíveis, as principais biomoléculas de interesse são os lipídios e carboidratos.

4.1 Condições que auxiliam na produtividade de lipídios

As microalgas em condições normais apresentam um teor lipídico entre 20-50% do seu peso seco, no enquanto a fração lipídica pode ser incrementada submetendo as culturas algais a condições de estresse (HU *et al.*, 2008). O estresse das culturas pode ser induzido de diferentes formas, como por exemplo, realizando a limitação de alguns nutrientes, como a fonte de nitrogênio (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000; RODOLFI *et al.*, 2009; SOLOVCHENKO *et al.*, 2008), variando a temperatura e pH, as concentrações de sais (KIM, B. H. *et al.*, 2016; SRIVASTAVA; NISHCHAL; GOUD, 2017) e as concentrações de CO₂ no fluxo de ar (BRENNAN; OWENDE, 2010), a partir destas alterações de cultivo, são gerados câmbios fisiológicos nas microalgas, diminuindo sua capacidade reprodutiva e produzindo maior conteúdo de lipídios (MILLER *et al.*, 2010). As primeiras pesquisas enfocadas no aumento do teor lipídico mostraram que a deficiência de nitrogênio nas culturas acrescenta o teor de lipídios nas células algais, entretanto a diminuição no crescimento celular é bastante considerável, sendo assim a produção de lipídios a partir de microalgas precisaria de duas etapas: na primeira sem limitação de nitrogênio para obter altas concentrações e na segunda com limitação de N₂ somente para estimular a sínteses dos lipídios.

Estudos como o realizado por (WIDJAJA; CHIEN; JU, 2009), aumentaram o teor de lipídios na microalga *Chlorella vulgaris*, para o qual usaram inicialmente um meio sem

limitação de nitrogênio (20 dias), logo após foi utilizado um sem nitrogênio (17 dias). Os resultados mostraram que as culturas para as que o N₂ foi limitado alcançaram um teor de lipídios de aproximadamente 43% e para aquelas culturas que o nitrogênio não foi limitado o conteúdo de lipídios foi consideravelmente inferior (~30 %). (FAN *et al.*, 2014) avaliaram a produção de lipídios limitando as fontes de ferro, fosforo e nitrogênio. Os resultados mostraram que a microalga *Chlorella pyrenoidosa* exibiu a maior produção de lipídios (47,05 mg⁻¹d⁻¹), limitando a fonte de nitrogênio. (SFORZA *et al.*, 2012) incrementou o conteúdo de lipídios de 11,5±3,1 % para 35,8±1,5 %, apenas limitando a fonte de nitrogênio. Conforme (GUSCHINA; HARWOOD, 2006), condições de estresse nas microalgas podem modificar os processos de sínteses de lipídios. Nessas condições a biossíntese dos lipídios é mantida ativa, não para a síntese de novos componentes da membrana, mas sim para síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos, como mecanismo de defesa. Esta condição pode aumentar o teor de lipídios em até 40%, mas só é possível em presença de suficiente luz e CO₂ (THOMPSON, 1996). Em condições normais de crescimento os ATP e os NADPH gerados no processo fotossintético são usados para gerar mais biomassa, sendo os aceptores ADP e NADP⁺. Enquanto o crescimento é afetado pela falta de nutrientes, o principalceptor de elétrons NADP⁺ pode-se tornar esgotado (SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012).

Outra forma de induzir o estresse microalgal é com a mistura de variações nas condições físicas e químicas ou nutricionais. Autores avaliaram o efeito da intensidade luminosa e a concentração de nitratos no meio sobre a microalga *Chlorella vulgaris* FACHB-31 em fotobiorreator de placas e de onda planar, os resultados mostraram que a concentração de lipídios na biomassa, bem como a concentração de biomassa, foi incrementada na medida em que aumentava a intensidade luminosa, obtivendo a maior concentração de lipídios (41,66% massa seca) utilizando intensidade luminosa de 560 μmol m⁻² s⁻¹ (LIAO *et al.*, 2017). Outro estudo avaliou a produção de lipídios e de biomassa da microalga *Botryococcus braunii*, controlando a intensidade luminosa e a concentração de CO₂. A máxima velocidade de crescimento foi 0,553 d⁻¹ e sua produtividade máxima de lipídios 26,57±2,23 mg L⁻¹ d⁻¹, em ambas as condições foram alcançadas a luminosidade de 6000 lux e uma concentração de CO₂ do 10% (HUANG *et al.*, 2017).

Autores como (HUI *et al.*, 2016) avaliaram o efeito da concentração de fosfato e ferro no meio BG11, assim como a concentração de CO₂ no fluxo de ar, sobre a concentração de lipídios na microalga *Tribonema minus*. A máxima concentração de lipídios obtida foi

384,67 mg L⁻¹d⁻¹, com 80 mg L⁻¹ de fosfato, 6.0 mg L⁻¹ de ferro, e 2.0% de CO₂ no fluxo de ar. (OLGUÍN, GALICIA, ANGULO-GUERRERO, & HERNÁNDEZ, 2001) avaliaram o teor de lipídios em *Spirulina sp* submetida à 66 e 144 μmol fóton m⁻²s⁻¹. Os resultados mostraram que as microalgas mantidas na menor intensidade de luz sintetizaram maior quantidade de lipídios atingindo um 28,6% do seu peso seco, para o caso das microalgas mantidas na maior luminosidade o teor de lipídios foi 18%.

O estresse microalgal pode ser induzido pela concentração de sal no meio, como por exemplo, (KALITA *et al.*, 2011) encontraram incremento na fração lipídica pela microalga *Ankistrodesmus falcatus*, medida que aumentava a concentração de sal no meio. A máxima produção de lipídio foi alcançada utilizando 0,17 M de NaCl. Conforme (XU; BEARDALL, 1997) o aumento da concentração dos sais incrementa o teor de lipídios intracelulares nas microalgas, como por exemplos: triglicerídeos, ácidos graxos saturados e mono insaturados; enquanto que a fração de ácidos graxos poli-insaturados diminui. (AZACHI *et al.*, 2002), encontraram que a adaptação da microalga *Dunaliella salina*, quando exposta a altas concentrações de sais gerava modificações na composição dos seus ácidos graxos intracelulares. Assim, por exemplo, as células que cresceram a uma concentração de 3,5 M de NaCl tinham uma proporção consideravelmente maior de ácidos graxos C18 (predominantemente insaturados), quando comparada com aquelas microalgas que cresceram a uma concentração de 0,5 M de NaCl, nas quais foi expresso maiormente o C16 (predominantemente saturados).

A limitação de enxofre também pode auxiliar na acumulação de ácidos graxos, pois pode originar fenômenos de estresse oxidativo na célula com a consequente geração de um maior teor de lipídios (GONZÁLEZ-BALLESTER *et al.*, 2010).. A aplicação de processos de mixotrofia nas culturas também incrementa a sínteses de lipídios, ou seja, as microalgas além de obter energia metabólica dos processos fotossintéticos também podem obter de fontes orgânicas e inorgânicas de carbono (SFORZA *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2012). Conforme (SFORZA *et al.*, 2012) o teor de lipídios foi incrementado de 11,5±3,1 % para 21,3±2,5 %, quando as condições do cultivo mudaram de autotróficas a mixotróficas (1% glicerol) respectivamente.

4.2 Condições que auxiliam na produtividade de hidrogênio

Diferentes tipos de microalgas têm sido estudados na produção de hidrogênio, entre elas pode-se citar: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides* (SENGMEE *et al.*, 2017), *Chlamydomonas reinhardtii* (KOSOUROV *et al.*, 2002; MARKOV; EIVAZOVA; GREENWOOD, 2006), *Dunaliella tertiolecta* (LAKANIEMI *et al.*, 2011), e *Nannochloropsis oceanica* (XIA *et al.*, 2013). O processo para a produção de hidrogênio com microalgas deve ser feito geralmente em duas etapas: na primeira etapa a microalga é inoculada no meio com todos os nutrientes, com tempo variando entre 8 e 72 horas; na segunda etapa a microalga deve ser submetida a lavagens e inoculada novamente em um meio sem enxofre e em condições de anaerobiose, geralmente suplementada com uma fonte orgânica de carbono.

A limitação de enxofre é necessária, pois nestas condições, não ocorre as sínteses dos aminoácidos metionina e cisteína, e conseqüentemente a síntese de proteínas, sendo assim, oxigênio é restringido e a respiração anula o processo fotossintético, produzindo hidrogênio (RASHID; LEE; MAHMOOD, 2011). Outra variável de interesse que precisa ser controlada na produção de hidrogênio é o pH. Conforme (SONG *et al.*, 2011) o pH propício para o crescimento das microalgas fica geralmente entre 5,0-9,0, dependendo do tipo de microalga usada. Segundo (SENGMEE *et al.*, 2017), o pH afeta significativamente a produção de hidrogênio, principalmente porque esta variável pode controlar a atividade da hidrogenase. Entretanto, conforme (RASHID *et al.*, 2013a) a produção de hidrogênio com microalgas pode ser aumentada usando fontes externa de carbono como: glicose, frutose, extrato de malte, bicarbonato de sódio e alguns ácidos orgânicos (KOSOUROV *et al.*, 2002; RASHID; LEE; MAHMOOD, 2011; SONG *et al.*, 2011).

Autores produziram hidrogênio usando duas etapas, a etapa de crescimento das microalgas foi feita com o meio MB (LIN, 2005), enquanto que a segunda etapa foi feita com o mesmo meio, porém a fonte de enxofre (Na_2SO_4) foi substituída por NaCl; e foi adicionada glicose (30 Mm). Nestas condições as produtividades de hidrogênio obtidas foram de 183 $\text{mL h}^{-1} \text{L}^{-1}$ e 238 $\text{mL h}^{-1} \text{L}^{-1}$ usando as temperaturas de 37 e 40 °C, respectivamente (SONG *et al.*, 2011). A produção de hidrogênio realizada em duas etapas, também foi estudada com as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella protothecoides* utilizando o meio Tris-acetato-fosfato modificado, utilizando glicerol como fonte externa de carbono (SENGMEE *et al.*,

2017). (RASHID *et al.*, 2013a) também produziram hidrogênio em duas etapas usando *Chlorella* imobilizada e otimizando o pH, bem como a utilização de fontes externa de carbono: glicose, frutose, sacarose e extrato de malte. O pH ótimo de 8,0 enquanto a dose ótima da fonte de carbono foi de 5 g/L. A sacarose foi a que mais gerou gás (1,315 ml L⁻¹) e a frutose a maior taxa de produção (24 ml L⁻¹ h⁻¹).

Outra estratégia de interesse para melhorar a produção de hidrogênio é a engenharia metabólica e genética, para o qual estão sendo estudados genes e rotas metabólicas que podem melhorar o rendimento. Assim por exemplo (LINDBERG *et al.*, 2002) inativaram com técnicas de mutagênese inserida o gene *hupL* que codifica uma ampla subunidade da enzima hidrogenase na cepa *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 e obtiveram uma velocidade de produção de hidrogênio de 14 ±3.5 nmol de H₂ (μgChla)⁻¹h⁻¹. Autores como (EKMAN *et al.*, 2011) inativaram a absorção da hidrogenase na cianobactéria *Nostoc punctiforme* a qual incrementou a liberação de H₂, obtivendo uma velocidade máxima de 120 nmol de H₂ (μgChla)⁻¹h⁻¹. (BAEBPRASERT *et al.*, 2011) incrementaram a produção de hidrogênio redirecionando elétrons pela via de assimilação do nitrato usando técnicas engenharia genética, as velocidades máximas de hidrogênio alcançadas foram 0,143 nmol de H₂ (μgChla)⁻¹h⁻¹ e 0,186 nmol de H₂ (μgChla)⁻¹h⁻¹. Conforme (BAEBPRASERT *et al.*, 2011) a rota do nitrato é uma via competitiva que pode limitar o fluxo de elétrons até a hidrogenase e desta forma diminuir a produção de hidrogênio. Pelo qual a rota metabólica de assimilação do nitrato foi alterada para redirecionar diretamente o fluxo de elétrons até a hidrogenase.

5. OBTENÇÃO DE BIOMOLÉCULAS COM USO DE RESÍDUOS LÍQUIDOS AGROINDUSTRIAIS

As microalgas são consideradas matéria prima sustentável e promissora para a produção de diferentes tipos de biomoléculas de interesse industrial (GALLEGO-CARTAGENA *et al.*, 2019; RUIZ *et al.*, 2016). Uma das aplicações mais conhecidas das microalgas é a produção de ácidos graxos para a produção de biodiesel, sendo atualmente avaliadas outras formas de bioenergia como a produção de biohidrogênio (MARTINEZ-BURGOS *et al.*, 2020), metano, e diferentes tipos de álcoois a partir destes microrganismos.

Entre as diferentes cepas de microalgas que tem sido utilizada para a produção de lipídios destacam-se *Nannochloropsis* sp, *Chlorella vulgaris*, *Schizochytrium* sp, *Scenedesmus quadricauda* com um teor de lipídios entre 50% e 90% em base seca (HAO ET

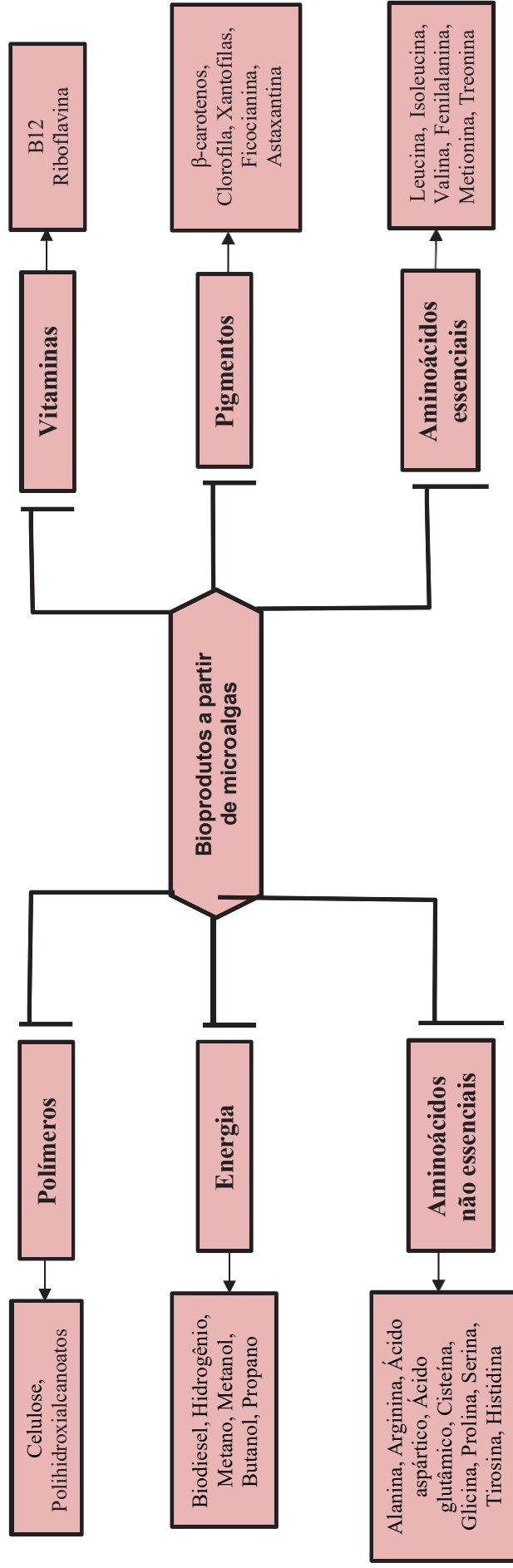
AL., 2020; ONUMAEGBU ET AL., 2019; VASISTHA ET AL., 2020). Dentre as cepas de microalgas que tem sido utilizada na produção de biohidrogênio destacam-se: *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chlorella vulgaris* entre outras (KHETKORN et al., 2017). A biomassa das microalgas é fonte hemicelulose (parede celular) a qual pode ser hidrolisada e empregada para a produção de álcoois (etanol, propanol e butanol) (LI et al., 2019), ou metano através de processos de gaseificação (GHOLKAR et al., 2021).

As microalgas também são fonte de diferentes tipos de pigmentos tais como clorofila a, b e c, β -caroteno, astaxantina, xantofilas, luteína etc. (BEGUM ET AL., 2016; GALLEGO-CARTAGENA ET AL., 2019). Segundo (AMADO and VÁZQUEZ, 2015) as microalgas potenciais para a produção destes compostos são *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum* sp. e *Haematococcus pluvialis*. Para produção de clorofila e carotenos têm sido empregadas algumas microalgas tais como: *Dunaliella Salina*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum*, *Microcystisis aeruginosa*, *Stichococcus* sp, *Chlorella* sp, *Selenastrum obliquus*, *Nannochloropsis gaditana*, *Synechococcus* sp (HOSIKIAN et al., 2010; Macías-SÁNCHEZ et al., 2008). Entre os efluentes que têm sido usados para produção de pigmentos estão águas residuais de processamento de mexilhão e camarão, águas residuais de cervejaria, águas residuais de processamento de arroz e vinhaça (GECIM et al., 2020; SANTANA et al., 2017; TREVISAN et al., 2020).

Por outro lado, as microalgas também têm sido usadas na produção de diferentes biopolímeros, como por exemplo, polihidroxialcanoatos, os quais são considerados promissores substitutos dos plásticos à base de petróleo (COSTA et al., 2019). Estes biocompostos são sintetizados e acumulados geralmente na fase estacionária de crescimento. De forma geral estes biopolímeros formam inclusões intracelulares para armazenar energia na forma de carbono (COSTA et al., 2018). Entre as microalgas que têm sido usadas para a produção polihidroxialcanoatos estão *Synechococcus* sp, *Nostoc muscorum*, *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, *Spirulina subsalsa*, *Synechococcus subsalsus*, *Aulosira fertilissima*, consórcios de microalgas entre outros. Além de ter sido usado reagentes puros também têm sido usadas águas residuais brutas como meio de cultura (CHAKRAVARTY et al., 2010; COSTA et al., 2019; RAHMAN et al., 2015). Na figura 3 outras potenciais aplicações das microalgas utilizando águas residuais como substrato são apresentadas. No entanto, os efluentes industriais e agroindustriais, além dos nutrientes, contêm alguns

compostos tóxicos que limitam as suas aplicações visto que as operações de purificação dos produtos tornam-se extremadamente complexas e altamente custosas.

Figura 3 - Bioprodutos potenciais a partir das microalgas.



Fontes: (GHOLKAR; SHASTRI; TANKSALE, 2021; KHETKORN *et al.*, 2017; LI, S. *et al.*, 2019; SANTANA *et al.*, 2017; VASISTHA *et al.*, 2020; ZHONG; CHENG, 2017)

6. PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS COM EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

Os combustíveis produzidos a partir da biomassa de algas são considerados na atualidade como uma das energias do futuro que podem substituir os derivados do petróleo (DEMIRBAS, 2010). Vários tipos de biocombustíveis são gerados usando microalgas e efluentes agroindústrias, no entanto os processos de produção podem ser diferentes.

6.1 Biodiesel a partir de microalgas

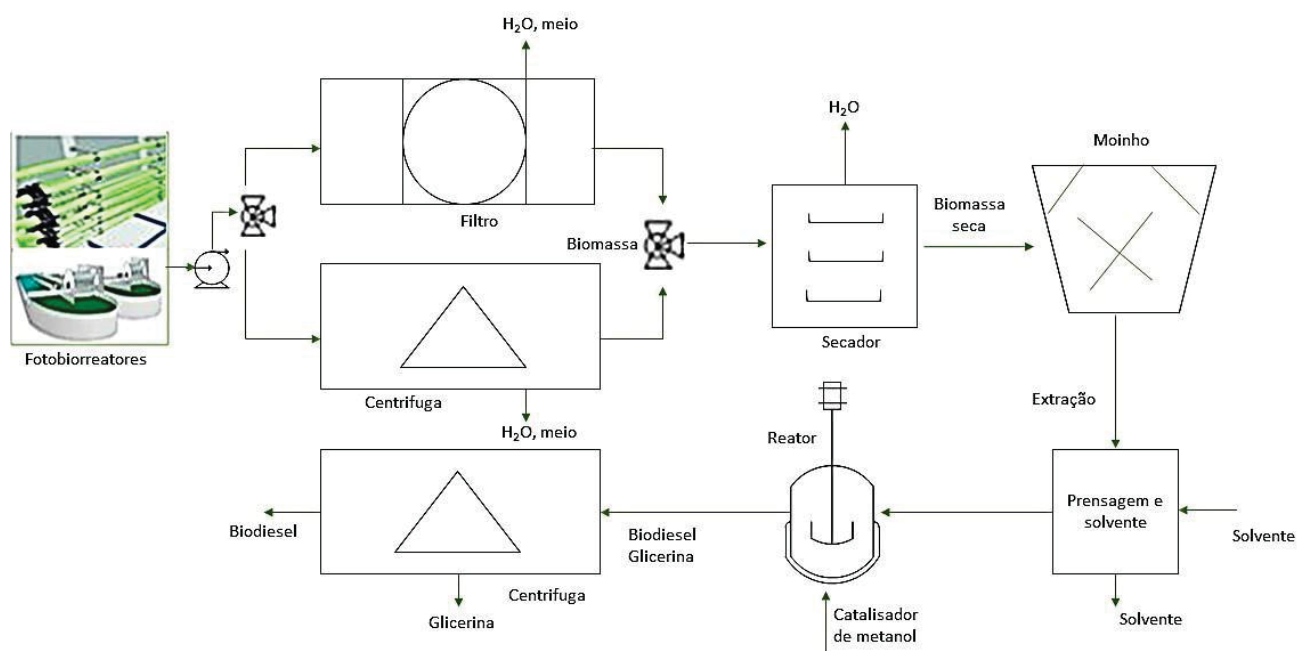
O processo de produção do biodiesel a partir das microalgas é iniciado com a definição das culturas de modo a obter cultivos com alto teor de lipídios, além de ter ácidos graxos de cadeia longa e de preferência com baixo grau de insaturação, sendo preferencialmente palmitoleico (16:1), oleico (18:1) e mirístico (14:0) etc., os quais diminuem as emissões tóxicas e melhora as características dos combustíveis (KNOTHE, 2008; SCHENK *et al.*, 2008). Uma das técnicas usadas para obter essa condição é a limitação de nitrogênio nos cultivos. Conforme a norma EM 14214, o teor de ácidos graxos poli-insaturados como o linolênico (18:3) no biodiesel não pode ultrapassar o 12%, e para o caso dos ácidos graxos com quatro ou mais insaturações (ácido araquidônico (20:4), eicosapentaenoico (20:5), docosaenoico (22:6) o conteúdo destes no biodiesel não pode ultrapassar 1,0%.

As microalgas têm que ser concentradas, conforme (PERALTA RUIZ *et al.*, 2012) esta etapa é crucial e pode aportar entre 20 e 30% dos custos do processo, além de poder afetar a qualidade do biodiesel. As operações mais recomendáveis são a centrifugação, a filtração (COBOS RUIZ M; JC; L, 2012), as quais tem eficiências de remoção de aproximadamente 90%. Adicionalmente para grandes volumes utiliza-se a floculação acompanhada da sedimentação. Essas operações juntas permitem concentrar a biomassa 20 a 50 vezes, além de reduzir os custos nessa etapa (KIRNEV *et al.*, 2018). Seguidamente a biomassa deve ser desidratada a temperaturas moderadas em torno de 50°C para não afetar a qualidade dos lipídios (MONTES PONCE, 2010). A secagem ao ambiente é o método menos custoso, porém, este método de desidratação é mais lento e necessita de grandes áreas superficiais.

Posteriormente a biomassa é fragmentada para facilitar a extração do óleo (LEE, S. J. *et al.*, 1998). Usando um moinho de microesferas (com esferas de 1 mm) para a

fragmentação de células de *Botryococcus braunii* foi possível obter rendimentos de óleo de 28,6% por biomassa seca. Alguns pesquisadores recomendam que a biomassa depois de ser concentrada deve ser primeiro fragmentada (micro-ondas-autoclave-acidificação) e depois secada (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Depois é feita extração do óleo, geralmente o método usado é a prensagem, no entanto este tem que ser acompanhado da extração com solventes orgânicos para aumentar a eficiência do processo. A extração só por prensagem pode retirar até 65% do óleo contido na biomassa, mas quando é combinado com a extração por solventes pode atingir até 95%, este sistema de extração pode ter custos de 1,90 €/kg de óleo extraído. Finalmente é feita transesterificação na qual o éster reage com o álcool e produz glicerina e ésteres ácidos graxos “Biodiesel” na presença de um catalisador que pode ser NaOH, KOH ou alguns tipos de lipases (figura 4) (LEE, O. K. *et al.*, 2015; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Figura 4 - Processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (CHISTI, 2007; YEN *et al.*, 2013)



6.2 Produção de Hidrogênio com microalgas

Outra fonte energética de interesse que pode ser obtida com as microalgas e efluentes industriais é o hidrogênio. Este biogás tem sido considerado um dos combustíveis do futuro por suas características e vantagens quando comparado aos outros tipos de combustíveis (DOLLY *et al.*, 2015). Atualmente é considerado uma das fontes energéticas mais promissoras, principalmente porque não libera partículas ou gases

poluentes que afetem a natureza e a vida humana (APAK; ATAY; TUNCER, 2017; BOCKRIS, 2013; MURADOV; VEZIROĞLU, 2008). A combustão do hidrogênio somente gera água, além disso, tem alto poder calorífico (119,93 kJ/g a 141,86 kJ/g) ou seja, aproximadamente 2,75 vezes mais energia que a gasolina (45,56 kJ/g a 50,36 kJ/g) e 4,3 vezes mais energia que o etanol (27,9 kJ/g a 29,4 kJ/g) (ARGUN; DAO, 2017; HASTUTI *et al.*, 2016; KAZAKOV; DUNIKOV; MITROKHIN, 2016; TAIFOR *et al.*, 2017).

O hidrogênio apesar de não estar de forma livre no ambiente pode ser obtido de diferentes formas através de processos termoquímicos da biomassa (pirólise, gasificação, combustão e liquefação), eletrólises da água (ESPOSITO, 2017; NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017) e processos fotossintéticos. Os organismos fotossintéticos que podem produzi-lo são algas verdes, diatomáceas e cianobactérias (KHETKORN *et al.*, 2017).

A geração nesse caso precisa de vários complexos enzimáticos, sendo as hidrogenases as principais responsáveis por catalisar a oxidação reversível do H₂ a partir de prótons e elétrons (KIM, D. H.; KIM, 2011). A direção da reação depende do potencial redox e dos demais componentes que interatuam com a enzima (NAGARAJAN *et al.*, 2016).

Para as cianobactérias o hidrogênio também pode ser produzido usando outros consórcios enzimáticos denominados nitrogenases (CARRIERI *et al.*, 2011). Estas enzimas convertem o N₂ em amoníaco e hidrogênio, no entanto esta reação é energeticamente ineficiente (RASHID *et al.*, 2013a). O estudo destas enzimas é essencial para compreender os mecanismos de produção do H₂, assim como as formas de aumentar sua produção.

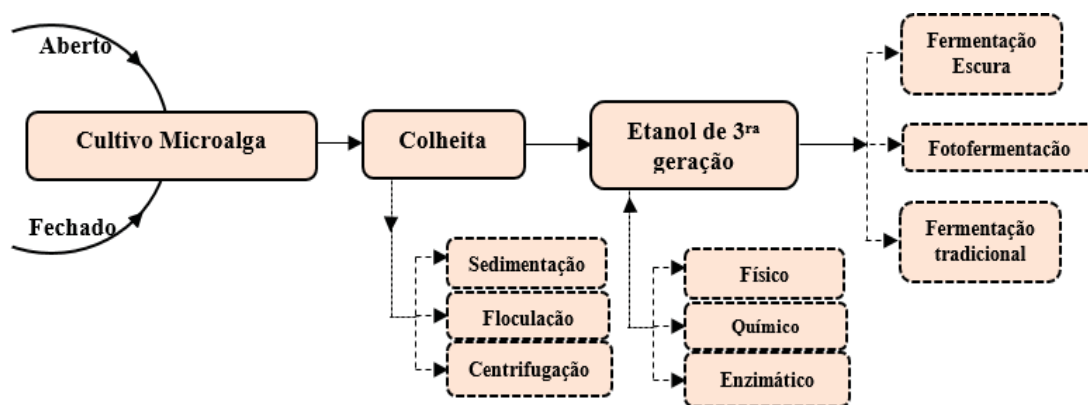
6.3 Produção de bioetanol a partir de microalgas

O bioetanol responde por mais de 94% da produção global de biocombustíveis, sendo a maioria proveniente da cana de açúcar (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008; ODJADJARE; MUTANDA; OLANIRAN, 2017). Porém, o conflito por matérias primas permitiu o surgimento de três tipos de gerações de biocombustíveis colocando as microalgas na terceira geração (JAMBO *et al.*, 2016; LAM; LEE, 2012; MAITY *et al.*, 2014). O alto teor de carboidratos (açúcares fermentáveis), além de não apresentar lignina

são as vantagens que as microalgas apresentam para a geração desse tipo de biocombustível (JOHN *et al.*, 2011; NGUYEN; VU, 2012; YEN *et al.*, 2013).

Para a geração de bioetanol os carboidratos serão consumidos por bactérias ou leveduras. Esse processo pode ser realizado de três possíveis formas: (I) pré-tratamento da biomassa acompanhada de uma hidrólise enzimática e finalmente um processo de fermentação por diferentes microrganismos. Algumas das leveduras usadas no processo são: *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilu*. (II) Fermentação escura, redirecionando a fotossíntese para a geração de hidrogênio e diferentes tipos de álcoois. Algumas microalgas e cianobactérias usadas nesse processo são: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *Chorella vulgaris*, *Oscillatoria limnetica*. (III) Uso de engenharia genética para conseguir uma produção mais eficiente (DE FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015; HO *et al.*, 2013; KIM, K. H. *et al.*, 2014; LAKATOS *et al.*, 2019; PHWAN *et al.*, 2018; ZHANG; ZHANG; CUI, 2014) (Figura 5). É importante considerar que a produção de biodiesel e bioetanol a partir de microalgas pode ser realizada em simultâneo, nesse caso os lipídios serão extraídos antes do processo de fermentação (LAM; LEE, 2012).

Figura 5 - (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017; LAKATOS *et al.*, 2019)

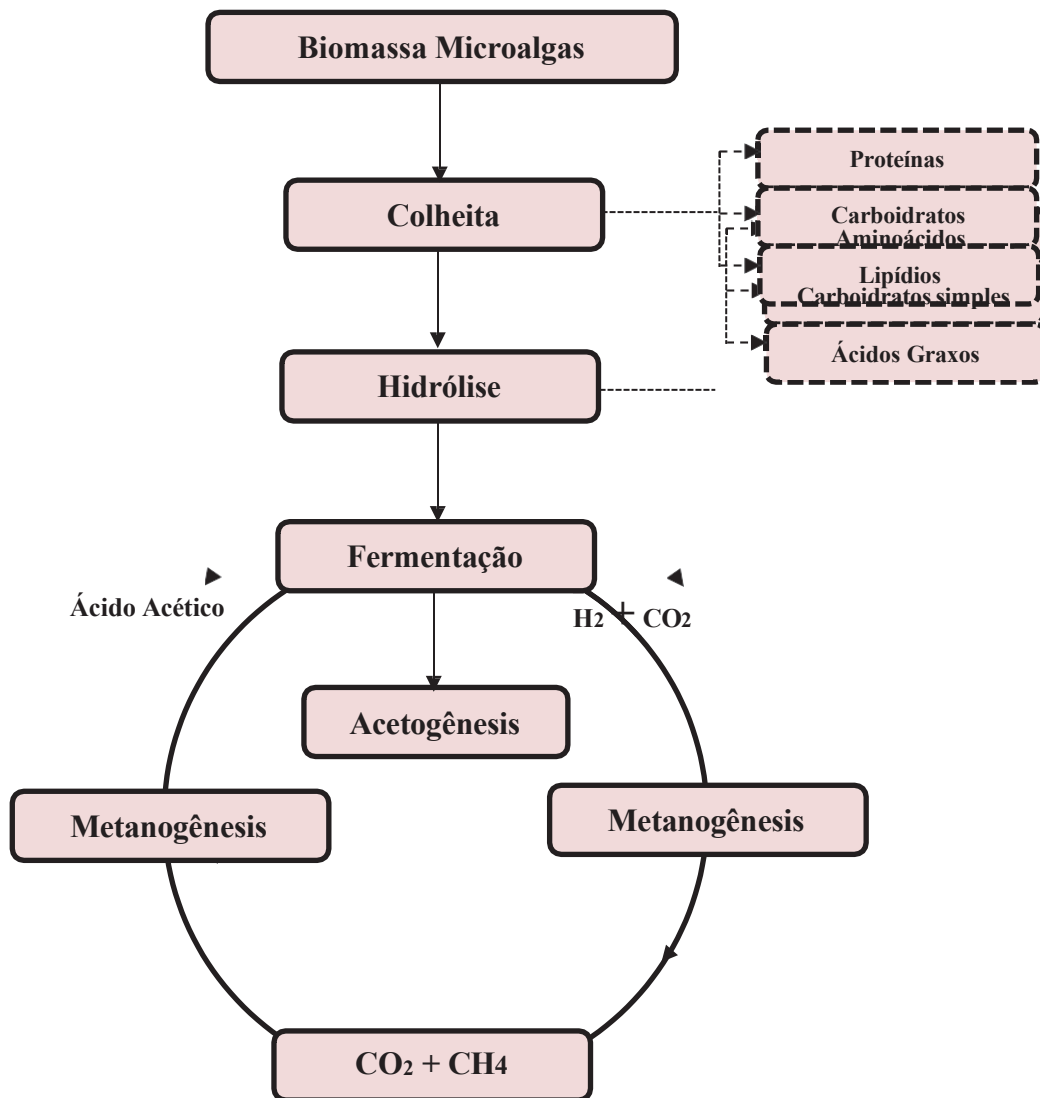


6.4 Produção de biogás a partir de microalgas

O biogás é basicamente uma mistura entre metano (55-75%), e dióxido de carbono (25-45%) que pode ser produzido mediante digestão anaeróbica da biomassa algal. Esse processo foi descrito pela primeira vez por (GOLUEKE; OSWALD; GOTAAS, 1957) e tem sido usado durante os últimos anos (GANESH SARATALE *et al.*, 2018; ZABED *et al.*, 2020; ZAMALLOA; BOON; VERSTRAETE, 2012).

O processo de digestão anaeróbica é basicamente a degradação do carbono orgânico em ácidos orgânicos e biogás e está constituído por 4 etapas: (I) hidrólise, (II) fermentação, (III) acetogênese e (IV) metanogênese (PASSOS *et al.*, 2014; ZABED *et al.*, 2020). Na figura 6 se descreve de produção de biogás a partir de microalgas. Em cada uma das etapas mencionadas trabalha um grupo específico de microrganismos. A hidrólise e acidogênese pode ocorrer pela ação de bactérias de alguns gêneros como: *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Thermomonospora*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus*. A etapa da acetogênese inclui algumas como: *Acetobacterium*, *Clostridium* enquanto a metanogênese pode ser realizada até por 65 espécies de archaea (WARD; LEWIS; GREEN, 2014; ZABED *et al.*, 2020; ZIGANSHIN *et al.*, 2013).

Figura 6 - Processo de produção de Digestão Anaeróbica utilizando biomassa algal (DE FARIAS SILVA; BERTUCCO, 2016; JAMBO *et al.*, 2016; ZABED *et al.*, 2020)



Pela complexidade da parede celular das microalgas é necessário um pré-tratamento da biomassa viabilizando a digestão anaeróbica (processos físicos, químicos e/ou biológicos) (GANESH SARATALE *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; PASSOS *et al.*, 2014). Portanto, o rendimento de metano depende da espécie de microalga, do pré-tratamento da biomassa de algas, a presença ou ausência de inibidores de metanogênese (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017; YADVIKA *et al.*, 2004).

Algumas das vantagens da produção de biogás a partir de microalgas são: a baixa quantidade de biomassa produzida durante o processo, os resíduos após a DA poderiam ser aproveitados como fertilizantes naturais (GANESH SARATALE *et al.*, 2018; JONES; MAYFIELD, 2012; MOHD UDAIYAPPAN *et al.*, 2017).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A qualidade e quantidade das biomoléculas obtidas no processo de produção microalgal são de extrema importância para viabilizar o processo, bem como a utilização de meios de cultivo alternativos visando minimizar custos.

Desta forma, pesquisas atuais e futuras estão focadas:

- No melhoramento das condições de cultivo, visando obter substratos que possuam os nutrientes necessários para o estímulo da produção de biomoléculas de interesse. Auxiliando no deslocamento de rotas metabólicas e otimizando o processo.

- Na diminuição do custo de produção, com a utilização de resíduos com alta carga nutricional, desta forma suprindo às necessidades nutritivas destes organismos, bem como auxiliando na destinação de resíduos que muitas vezes podem gerar diversos problemas ambientais.

- Nos ensaios de aumento de escala, visto que atualmente existem muitos estudos em escala laboratorial, o que muitas vezes não reproduz veridicamente condições de produção em larga escala.

- Na seleção de novas linhagens e manipulação genética de micro-organismos, com o objetivo de obter organismos resistentes e com maior capacidade de produção de biocombustíveis.

8. CONCLUSÃO

A partir dos dados levantados, pode-se verificar que a utilização de microalgas cultivadas com efluentes agroindustriais é promissora para a produção de

biocombustíveis. Existem diversas espécies de microalgas que possuem a capacidade de produzir elevados teores de biomassa e biomoléculas, utilizando como substrato efluentes agroindustriais. A produção de biodiesel, bioetanol e biohidrogênio é amplamente citada e estudada, porém ainda existe pouca implementação em grande escala, gerando a necessidade de maiores pesquisas neste quesito.

Artigo 1:

Strategic Parameter Optimization for Improved Outcomes in yeast autolysis

RESUMO

Investigando a influência da temperatura, pH, e salinidade no rendimento de proteínas solúveis durante a autólise de leveduras empregadas tanto na fabricação de cerveja quanto na fermentação de cana de açúcar, a pesquisa utiliza um Desenho Central Composto Rotacional (DCCR) para avaliar meticulosamente esses parâmetros. Crucial para a liberação de componentes intracelulares, a autólise é de particular interesse na biotecnologia, visando a recuperação eficiente de subprodutos como proteínas. A análise revelou que 50°C é a temperatura ótima, enquanto um ambiente de pH de ligeiramente ácido a neutro favorece a autólise, e a influência da salinidade varia conforme a origem da levedura. A eficiência do processo autolítico foi determinada pela quantificação de proteínas solúveis, utilizando o método de Bradford, uma técnica padrão na bioquímica para medir a concentração proteica. Destaca-se que os rendimentos proteicos são mais elevados nas fases iniciais da autólise, sugerindo a vantagem de uma coleta antecipada para maximizar a extração de proteínas. Comparativamente, as leveduras de cerveja mostraram-se mais eficientes na liberação de proteínas que as de cana de açúcar, com rendimentos de 85,39% e 34,21%, respectivamente. Este trabalho contribui significativamente para a compreensão das condições ótimas de autólise, com implicações diretas para a otimização da recuperação de subprodutos valiosos, promovendo processos industriais mais sustentáveis e econômicos. A investigação das características das proteínas extraídas e a exploração de suas aplicações potenciais, além da aplicação de técnicas de bioprocessamento avançadas, são identificadas como áreas promissoras para futuras pesquisas.

Palavras-chave: autólise de levedura; otimização de parâmetros; proteínas solúveis; *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

No cenário em evolução da biotecnologia e fermentação industrial, a otimização de bioprocessos para máxima eficiência e qualidade de saída tornou-se uma área crítica de pesquisa. Entre esses processos, a autólise de levedura destaca-se como uma reação bioquímica fundamental com vastas aplicações que vão desde as artes culinárias, onde melhora sabores em alimentos e bebidas, até a biotecnologia, onde facilita a extração de compostos intracelulares valiosos (FUNDO et al., 2023). A autólise de levedura, o processo de auto-digestão pelo qual as células de levedura se decompõem, liberando seus conteúdos, tem sido reconhecida por seu potencial para contribuir significativamente para a inovação de produtos e processos em várias indústrias. No entanto, a complexidade deste processo, influenciada por numerosos parâmetros ambientais e fisiológicos, apresenta um desafio substancial para sua otimização e controle (RIVERA FLORES et al., 2023).

O foco está na otimização sistemática de parâmetros que afetam a autólise de levedura para aprimorar a eficiência e eficácia do processo. A pesquisa abrange uma análise abrangente das condições sob as quais ocorre a autólise de levedura, incluindo temperatura, pH, força iônica e a presença de enzimas autolíticas (SANTANA; MEIRELES, 2023). Investigar as interações complexas entre essas variáveis visa identificar condições ótimas que maximizem o rendimento de produtos desejáveis, minimizando subprodutos indesejados e consumo de energia. A otimização desses parâmetros é significativa para melhorar a qualidade do produto e aumentar a sustentabilidade e viabilidade econômica dos processos industriais que dependem da autólise de levedura (PERMYAKOVA et al., 2023).

As implicações dos parâmetros de autólise de levedura otimizados abrangem não apenas os benefícios imediatos de rendimentos aumentados e qualidade do produto, mas também o potencial para vantagens ambientais significativas por meio da redução de resíduos e consumo de energia (NGUYEN et al., 2020). Processos de autólise eficientes promovem práticas mais sustentáveis em indústrias-chave como cervejaria, panificação e farmacêutica, onde a levedura desempenha um papel integral. Concorrentemente, este estudo se esforça para conectar a pesquisa teórica e aplicações práticas na autólise de levedura, fornecendo uma análise profunda dos parâmetros otimizados e seus efeitos sobre o processo de autólise e oferece insights críticos para profissionais da indústria que

visam capitalizar esses desenvolvimentos (CIOBANU et al., 2023). O emprego de técnicas analíticas avançadas e ferramentas de modelagem é essencial para elucidar as dinâmicas complexas da autólise, facilitando assim o advento de aplicações inovadoras e melhorias de processos. Esta exploração abrangente destaca a natureza multifacetada da autólise de levedura e seu potencial transformador em diversos setores dependentes deste processo biológico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Planejamento Experimental

Conduziu-se um estudo exploratório utilizando um Desenho Central Composto Rotacional (DCCR) para examinar o efeito da temperatura, pH e salinidade no rendimento de proteínas durante a autólise de leveduras provenientes de duas fontes distintas: a fabricação de cerveja e a fermentação de cana de açúcar.

2.2 Fatores e Níveis

O estudo foi estruturado em torno de três variáveis independentes: a temperatura foi analisada em três níveis codificados como -1 (40°C), 0 (50°C) e +1 (60°C), com pontos axiais estendendo-se a -1.682 (33,18°C) e +1.682 (66,82°C). O pH foi avaliado nos níveis -1 (pH 2), 0 (pH 4) e +1 (pH 6), com extensões axiais para -1.682 (pH 0,636) e +1.682 (pH 7,364). Por fim, a salinidade foi investigada em -1 (3%), 0 (6%) e +1 (9%), com pontos axiais a -1.682 (0,9546%) e +1.682 (11,0454%). Os pontos centrais para cada fator foram codificados como 0, e o experimento incluiu três corridas no ponto central para avaliar a repetibilidade e a variabilidade experimental (tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4 - Variável resposta organização do planejamento experimental

Variável resposta	Y - Proteínas (Bradford)
Fatores	Temperatura pH Salinidade
Nº de tratamentos	2 ³
Nº de replicas	2
Nº de corridas	17

Tabela 5 - Fatores codificados e não codificados para o planejamento experimental

Fator	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	50	60
pH	2	4	6
Salinidade (%)	3	6	9

Tabela 6 - Tabela de experimentos do planejamento experimental

Ensaio	pH	Salinidade (%)	Temperatura (°C)
1	2,00	3,00	40,00
2	2,00	9,00	40,00
3	6,00	3,00	40,00
4	6,00	9,00	40,00
5	2,00	3,00	60,00
6	2,00	9,00	60,00
7	6,00	3,00	60,00
8	6,00	9,00	60,00
9	4,00	6,00	33,18
10	4,00	6,00	66,82
11	0,64	6,00	50,00
12	7,36	6,00	50,00
13	4,00	0,95	50,00
14	4,00	11,05	50,00
15	4,00	6,00	50,00
16	4,00	6,00	50,00
17	4,00	6,00	50,00

2.3 Preparação dos Cremes de Levedura

Os cremes de levedura foram preparados seguindo os procedimentos padrões da indústria para a fabricação de cerveja e fermentação de cana de açúcar. Após a conclusão dos processos de fermentação, os cremes foram separados dos demais subprodutos, concentrados por centrifugação e armazenados a -20 °C até o uso.

2.4 Processo de Autólise

A autólise foi induzida pela incubação dos cremes de levedura nas condições estabelecidas pelo planejamento fatorial. As amostras foram incubadas em banho-maria (SL 155 – SOLAB) a temperatura controlada e o pH foi ajustado usando soluções padrão de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A salinidade foi estabelecida pela adição de cloreto de sódio nas concentrações desejadas. Amostras foram retiradas com o tempo inicial de 15 minutos, e logo após, pelas próximas 12 horas consecutivas.

2.5 Quantificação de Proteínas

No estudo em questão, empregou-se o método de Bradford para a determinação da concentração de proteínas, adaptando-o para uso em microplacas ELISA, visando uma análise eficiente e precisa. O reagente de Bradford utilizado foi preparado a partir de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, diluído em uma solução contendo ácido fosfórico e etanol (KIELKOPF; BAUER; URBATSCH, 2020).

As amostras de proteína sob investigação e os padrões, utilizando albumina sérica bovina (BSA) em concentrações conhecidas, foram preparadas e realizadas em triplicata. A diluição das amostras foi realizada em tampão fosfato salino (PBS), adequando as concentrações ao intervalo de detecção do ensaio. A cada poço de uma microplaca de 96 poços adicionou-se 50 µL da amostra ou padrão de BSA, seguido pela adição de 250 µL do reagente de Bradford, estabelecendo uma proporção de 5:1 entre o reagente e a amostra. Para assegurar uma mistura homogênea, a microplaca foi suavemente agitada.

Após a adição do reagente, as microplacas foram incubadas à temperatura ambiente por um período de 20 minutos. Esse tempo de incubação foi determinado como o mais adequado para promover uma ligação efetiva entre o corante e as proteínas, além de permitir o desenvolvimento completo da cor. A conclusão da incubação foi seguida por uma leitura espectrofotométrica a 595 nm, realizada em um leitor de microplacas (Power Wave XS – Biotek). A correlação entre a intensidade da cor desenvolvida e a concentração de proteínas nas amostras permitiu a quantificação precisa das mesmas.

A construção de uma curva padrão de calibração, utilizando as leituras de absorbância dos padrões de BSA, facilitou a determinação das concentrações das amostras desconhecidas.

3. RESULTADOS

3.1 Malte

O expressivo rendimento de proteínas solúveis no sobrenadante, evidenciado pelo valor de 85,39 (%) na tabela 7, está intrinsecamente relacionado à quebra eficiente da parede celular das leveduras, um evento característico da lise celular. A temperatura de 40°C, um pH próximo ao neutro de 6 e uma salinidade de 9%, juntos, criaram um ambiente que promoveu a autólise de forma otimizada.

A temperatura de 40°C demonstrou ser uma temperatura ótima para a solubilização das proteínas sem causar sua desnaturação extensiva. Essa condição térmica provavelmente acelera as reações enzimáticas sem ultrapassar o limite térmico da estabilidade enzimática. A estabilidade das proteínas extraídas é crítica, pois proteínas desnaturadas podem perder suas propriedades funcionais desejadas, além de serem menos solúveis. Yin (2015) destacou que a temperatura ótima para autólise era de 47,5 °C, com uma fração de massa de NaCl de 2% e pH de 4,5, demonstrando como esses fatores podem influenciar diretamente a eficiência da autólise e a subsequente liberação de proteínas (YIN, et al., 2015).

O pH 6, próximo do neutro, é adequado para manter a integridade das enzimas que catalisam a autólise e pode também minimizar a desnaturação das proteínas durante o processo de extração. Além disso, este pH pode ajudar a manter a solubilidade das proteínas, o que é crucial para maximizar o rendimento. Alves, Souza, e Neto (2021) propuseram uma estratégia baseada na diminuição do pH da suspensão de levedura no início da autólise, que poderia acelerar o processo de autólise da *Saccharomyces cerevisiae*, enfatizando a importância da temperatura e do pH na otimização da produção de extrato de levedura (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021c).

A salinidade de 9% não parece impor um estresse osmótico que prejudique significativamente a integridade ou a funcionalidade das proteínas liberadas, o que é evidenciado pelo alto rendimento obtido. Em concentrações salinas maiores, poderia haver um risco de precipitação proteica, o que reduziria o rendimento de proteínas solúveis. Frigon e Liu (2016) investigaram a operação de lodo ativado por leveduras sob diferentes salinidades, evidenciando que o choque de sal afeta a taxa de crescimento máximo, mas o tratamento ainda é eficaz. Este estudo sugere que a capacidade das leveduras de se adaptar a condições salinas pode ter implicações na eficiência da lise celular e na liberação de proteínas (FRIGON; LIU, 2016).

Durante o processo autolítico, as enzimas hidrolíticas endógenas da levedura, como as glucanases e proteases, são ativadas ou liberadas, levando à degradação da parede celular e à subsequente liberação de componentes intracelulares no meio. O ambiente térmico proporcionado contribuiu para acelerar a atividade dessas enzimas sem comprometer a integridade e a funcionalidade das proteínas liberadas. O pH 6, mantendo a atividade enzimática, permitiu uma degradação controlada e eficaz da parede celular. A salinidade não suficientemente alta para causar inibição osmótica também foi favorável à lise.

Esse fenômeno de lise é crucial porque a parede celular da levedura é um compartimento robusto, projetado para proteger a célula de condições adversas. A sua quebra permite que as proteínas, que de outra forma estariam contidas dentro do citoplasma ou associadas às estruturas celulares, sejam liberadas no meio externo, o sobrenadante, onde podem ser facilmente colhidas.

A alta taxa de liberação de proteínas para o sobrenadante é particularmente vantajosa para a indústria, pois simplifica o processo de coleta e purificação destes valiosos componentes bioquímicos. Para as aplicações biotecnológicas, o entendimento das condições que promovem essa quebra efetiva da parede celular é essencial para maximizar a recuperação de proteínas e otimizar a valorização de subprodutos da fermentação.

A avaliação e o aproveitamento desse pico de rendimento proteico logo no início do processo de autólise ressaltam a importância de um monitoramento temporal fino e ajustes de processos, visando maximizar a produção e qualidade de extratos proteicos para uma variedade de aplicações industriais.

Tabela 7 – Rendimentos (%) obtidos na autólise de levedura proveniente da fabricação de malte

Temperatura (°C)	40	40	40	40	60	60	60	60	60	50	50	50	50	50	50	50	33	67
pH	2	2	6	6	2	2	6	6	6	0,63	7,36	4	4	4	4	4	4	4
Salinidade (%)	3	9	3	9	3	9	3	9	3	6	6	0,95	11	6	6	6	6	6
Tempo (h)																		
0,25	4,11	3,10	76,14	85,39	14,04	5,86	48,97	38,62	20,56	52,75	18,58	17,34	21,22	14,12	16,60	11,64	14,62	
1	6,30	4,61	40,13	48,89	17,67	6,77	17,10	17,84	18,83	37,16	16,77	14,37	16,18	17,59	17,34	16,60	10,98	
2	6,92	4,83	42,12	26,92	16,60	7,74	12,55	20,89	9,69	15,85	8,97	4,00	4,72	6,42	5,55	18,09	15,77	
3	7,13	4,48	30,56	29,73	19,41	8,34	14,20	16,93	9,33	16,38	7,88	4,29	4,86	7,37	4,61	13,13	9,75	
4	9,25	3,80	20,65	46,08	17,26	8,18	12,88	19,08	6,28	19,98	12,89	9,11	10,60	11,88	12,64	13,79	14,29	
5	8,59	7,93	26,26	15,86	15,94	8,09	15,20	18,58	15,51	14,13	13,04	8,29	10,93	10,98	8,39	16,35	7,68	
6	15,69	4,46	26,76	19,65	17,75	7,76	14,34	15,36	12,78	18,22	11,44	7,48	8,79	9,62	9,19	16,93	10,08	
7	13,05	5,45	35,84	18,17	15,86	8,01	11,53	14,20	10,28	18,85	10,54	6,40	8,70	10,93	10,17	17,67	13,46	
8	15,86	6,99	31,13	20,98	13,30	7,85	15,69	15,86	14,49	18,08	12,14	7,88	8,78	10,86	10,06	14,95	10,16	
9	14,04	6,88	39,06	22,87	16,93	6,77	17,10	18,01	13,38	18,01	10,98	6,62	8,93	11,17	9,62	15,44	9,00	
10	24,94	8,26	21,56	23,37	15,28	9,33	14,12	16,82	22,19	24,18	11,49	14,83	8,57	11,00	10,42	17,75	12,89	
11	16,02	11,73	28,58	18,91	19,13	7,51	15,94	18,91	21,58	23,54	11,51	12,57	11,18	12,14	6,61	16,27	11,20	

3.2 Cana de açúcar

Os dados da Tabela 8 apresentam os rendimentos obtidos na autólise de levedura proveniente da fermentação de cana de açúcar, sob diferentes condições de temperatura, pH, salinidade e ao longo do tempo. Aqui, o valor máximo observado foi de 34,21 %, ocorrendo a 60°C, com pH 2 e salinidade de 9% logo no início do processo (0,25 horas). Este resultado é comparativamente menor do que o maior rendimento visto na tabela anterior relacionada à fermentação de cerveja, que foi superior a 50.

A diferença nos valores de pico de rendimento entre as duas tabelas pode ser explicada por diversos fatores. Primeiramente, a matéria-prima e o processo de fermentação distintos (cana de açúcar para álcool e malte para cerveja) provavelmente resultam em diferentes composições das leveduras ao final do processo fermentativo. Essas composições distintas podem influenciar diretamente o potencial e a eficiência da autólise, refletindo na quantidade de compostos, como proteínas, liberados durante o processo.

Em relação à temperatura, enquanto a temperatura mais alta de 40°C na Tabela 2 resultou no maior rendimento para a levedura da cana de açúcar, na fermentação cervejeira a temperatura de 50°C foi mais eficaz. Isso sugere que as leveduras utilizadas na produção de cachaça possam ter uma tolerância maior à temperatura para a autólise ou uma atividade enzimática otimizada em temperaturas mais elevadas.

Quanto ao pH, os resultados mais altos para autólise de levedura de cana de açúcar condições ácidas (pH 2). No entanto, o valor mais elevado na fermentação de cerveja foi obtido em pH 6. Isso pode indicar que, apesar de um ambiente ácido poder favorecer a autólise pela desestabilização da parede celular, as leveduras da cerveja podem ter um conjunto de enzimas que mantêm atividade ótima em um pH mais próximo ao neutro, resultando em maior liberação de componentes celulares.

A salinidade também parece ter um impacto variável, mas em ambas as situações, a autólise não foi inibida por altas salinidades, e sim potencialmente favorecida, como indicado pelos maiores rendimentos em salinidades 3 e 9%.

Finalmente, o tempo zero mostrou-se como o ponto de maior rendimento para a levedura da cana de açúcar, semelhante ao observado para a levedura cervejeira. Isso reforça a ideia de que as condições iniciais de autólise são cruciais para a liberação de compostos intracelulares e que ajustes nas condições de autólise devem ser feitos levando

em conta as características específicas da levedura e do processo de fermentação ao qual ela foi submetida.

Essas comparações e considerações sublinham a complexidade da autólise e a importância de ajustar os processos de acordo com o tipo de levedura e as condições de fermentação para otimizar a recuperação de valiosos compostos bioquímicos.

Tabela 8 – Rendimentos (%) obtidos na autólise de levedura proveniente da fermentação de cana de açúcar

Temperatura (°C)	40	40	40	40	60	60	60	60	50	50	50	50	50	50	50	50	33	67
pH	2	2	6	6	2	2	6	6	0,63	7,36	4	4	4	4	4	4	4	4
Salinidade (%)	3	9	3	9	3	9	3	9	6	6	0,95	11	6	6	6	6	6	6
Tempo (h)																		
0,25	15,32	7,72	12,16	15,19	34,21	7,90	14,99	15,48	23,62	12,00	23,35	22,63	16,70	12,34	21,64	12,24	17,15	
1	11,74	9,63	13,18	11,17	26,76	11,40	16,61	14,55	25,05	22,18	21,91	25,41	20,86	20,11	21,82	1,67	15,27	
2	13,79	9,70	9,61	11,98	23,26	14,01	23,53	16,16	8,59	8,54	4,61	3,69	2,76	1,96	3,30	18,59	13,47	
3	14,13	8,91	11,69	10,77	23,44	11,94	22,36	16,61	10,23	6,63	7,43	5,05	3,11	2,48	3,85	17,63	14,46	
4	12,21	8,44	4,49	10,77	26,31	14,99	21,28	18,41	17,30	13,28	11,88	9,57	8,96	7,62	10,07	19,30	16,55	
5	15,63	14,37	10,96	13,83	19,93	14,82	15,18	26,67	15,44	14,89	8,53	10,28	8,93	9,23	9,86	20,74	16,07	
6	15,08	6,29	10,06	7,01	17,51	16,07	20,56	17,51	12,32	12,95	7,96	8,20	6,91	7,01	7,91	22,90	14,73	
7	10,41	17,78	10,24	4,67	21,73	18,05	19,30	20,47	14,49	11,28	8,30	7,25	7,14	6,40	7,62	18,41	19,30	
8	22,99	11,85	11,50	12,93	18,41	13,38	22,09	24,58	14,26	11,30	8,20	7,12	7,04	5,40	7,80	18,77	24,96	
9	1,62	11,68	3,05	11,32	28,02	17,42	21,64	24,16	16,57	9,88	6,80	8,13	8,09	5,96	7,06	28,59	9,25	
10	16,70	7,54	8,98	6,65	31,34	18,23	27,21	20,38	23,16	19,39	9,51	12,36	13,62	15,55	16,23	23,44	14,10	
11	16,10	8,44	9,88	2,69	28,55	17,15	25,50	16,25	22,71	21,29	7,85	12,60	13,99	14,61	16,59	24,07	16,31	

4. CONCLUSÃO

O estudo implementado através de um Desenho Central Composto Rotacional (DCCR) elucidou efetivamente a influência significativa da temperatura, pH e salinidade no rendimento de proteínas durante o processo de autólise de leveduras oriundas da fermentação de malte e de cana de açúcar. Observou-se que a temperatura mais favorável para a autólise das leveduras e a subsequente liberação de proteínas foi a moderada de 50°C, que serviu como o ponto central ótimo para ambos os tipos de levedura. O pH revelou um comportamento mais propício para a autólise em condições que variam de ligeiramente ácidas a neutras, enquanto a salinidade apresentou um efeito variável, dependendo da origem da levedura.

Notavelmente, os rendimentos mais elevados de proteínas foram registrados no início do processo autolítico, indicando que o tempo é um fator crítico para a eficácia na extração de proteínas e que estratégias de coleta precoce podem ser vantajosas para otimizar este rendimento. A comparação entre as leveduras de cerveja e de cana de açúcar indicou que as leveduras cervejeiras demonstraram maior capacidade de liberação de proteínas sob as condições experimentais aplicadas, sendo os rendimentos obtidos de 85,39 % e 34,21 %, respectivamente.

Este estudo adiciona conhecimento significativo ao campo da biotecnologia, proporcionando informações valiosas para a indústria de fermentados sobre a manipulação eficiente das variáveis de autólise para aprimorar a recuperação de subprodutos de alto valor. Investigar mais profundamente a natureza das proteínas extraídas e as potenciais aplicações dos extratos proteicos representa uma direção promissora para pesquisas futuras. A adoção de técnicas de bioprocessamento que ajustem de forma dinâmica as condições de autólise poderia também promover processos mais sustentáveis e economicamente viáveis.

Artigo 2:

"Sustainable Innovation: Omega-3 Production via *Schizochytrium Limacinum* Using
Agro-Industrial and Biodiesel Production Residues

1. INTRODUÇÃO:

A busca por alternativas sustentáveis para a produção de compostos bioativos tem direcionado a atenção da comunidade científica para o potencial biotecnológico de microorganismos marinhos, especialmente microalgas e traustochytridos. Dentro deste grupo, *Schizochytrium limacinum*, um microorganismo heterotrófico da família Thraustochytriidae, emergiu como um candidato promissor devido à sua capacidade de produzir ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs), incluindo o ácido docosahexaenoico (DHA) (FENG et al., 2023). O DHA é um componente crucial para o desenvolvimento e manutenção da saúde cerebral e visual em humanos, além de ser fundamental para a nutrição de peixes em aquicultura. A capacidade de *S. limacinum* de crescer em meios heterotróficos, utilizando diversas fontes de carbono, oferece uma vantagem significativa sobre microalgas fototróficas, permitindo uma maior densidade celular e, conseqüentemente, uma produção mais eficiente de biomassa e lipídios (OLIVER et al., 2022).

Entretanto, a viabilidade econômica da produção de DHA por *S. limacinum* é fortemente influenciada pelos custos associados aos meios de cultura, especialmente as fontes de carbono e nitrogênio (BOURAS et al., 2022). Neste cenário, a utilização de subprodutos e resíduos industriais como substratos para o cultivo de microalgas apresenta uma oportunidade para reduzir custos e melhorar a sustentabilidade do processo. Os resíduos de milhocina, um subproduto da moagem úmida de milho, são ricos em carboidratos e proteínas, oferecendo uma fonte econômica de nutrientes (Ju 2020). O creme de levedura, resultante dos processos de fermentação, é uma fonte concentrada de vitaminas, aminoácidos e minerais, enquanto o glicerol, um subproduto da produção de biodiesel, serve como uma fonte de carbono de fácil assimilação para muitos microorganismos, incluindo *S. limacinum* (TALBIERZ et al., 2022a).

O objetivo do presente trabalho é explorar o potencial destes resíduos industriais como substratos para o cultivo de *Schizochytrium limacinum*, detalhando não apenas a viabilidade técnica, mas também as implicações ambientais e econômicas. Ao integrar resíduos de milhocina, creme de levedura e glicerol no processo de cultivo, este estudo propõe uma abordagem circular que não só melhora a eficiência produtiva e a sustentabilidade, mas também contribui para a redução da pegada ambiental da produção de biomassa microbiana e seus derivados. Ao fornecer uma análise aprofundada do crescimento, produção de lipídios e perfil de ácidos graxos de *S. limacinum* em resposta

a esses substratos alternativos, o presente trabalho lança luz sobre estratégias inovadoras para o cultivo de microorganismos marinhos, abrindo caminhos para o desenvolvimento de processos biotecnológicos mais sustentáveis e economicamente viáveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção de cepas e preparo dos INÓCULOS

O microrganismo selecionado para a produção é da família Traustochytriales, especificamente a cepa *Schizochytrium limacium* SR21, conservado a -80°C. Para reativá-la, utilizou-se o meio líquido GYPS (Glicose, Extrato de Levedura, Peptona e Sal Marinho). Após o descongelamento, inoculou-se em cabine de fluxo laminar, em Erlenmeyers de 125 ml com 10 ml de GYPS estéril (composição: 10 g/l de glicose, 1 g/l de peptona, 1 g/l de extrato de levedura, 28 g/l de sal marinho). A reativação prosseguiu por 48 horas a 28 °C, com agitação de 120 rpm, em incubadora Shaker refrigerada de movimento orbital, modelo NT715. Concluída essa fase, transferiram-se os inóculos para novos frascos com 40 ml de GYPS estéril, mantendo-se as mesmas condições por 48 horas, para promover a proliferação ideal. Todas as etapas foram realizadas em triplicata.

2.2 Otimização da produção em frascos ERLLENMEYER

O bioprocesso para produzir ômega-3 começa a ser testado e otimizado a partir do nível de bancada, antes de ser escalonado para um volume de trabalho maior em um biorreator com capacidade para 10 litros de produção. Os experimentos focaram em testar alguns resíduos para a produção de ômega-3. Os resíduos utilizados foram a milhocina (corn steep liquor), creme de levedura (residual yeast cream) e glicerol.

Em todos os experimentos feitos em triplicata, frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 45 ml de meio de fermentação, onde foram testados os resíduos citados anteriormente e o meio padrão GYPS, a taxa de inóculo foi 10%, sendo adicionado 5 mL do inóculo proliferado. Os frascos foram incubados em shaker a 28 °C e 120 rpm por 5 dias.

As concentrações de milhocina (corn steep liquor), creme de levedura (residual yeast cream) e glicerol utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (COLONIA, B. S. O., 2021), e podem ser visualizadas na tabela 9:

Tabela 9 - Testes preliminares dos resíduos

Teste	Glicerol (% v/v)	Milhocina (g/L)	Creme de levedura (g/L)	Sal marinho (g/L)
Milhocina	10	30	-	10
Creme de levedura	10	-	30	10
Mix	10	24,5	6	10

A partir dos resultados obtidos no teste preliminar, foi realizado um planejamento experimental DCCR para a obtenção da melhor condição de crescimento celular (X) e produção de lipídios. Foram realizados paralelamente dois planejamentos, a fim de comparar a utilização de glicerol padrão (PA) e glicerol bruto, obtido no processo de produção de biodiesel (Tabela 10).

Tabela 10 - Ensaios do planejamento DCCR

Ensaios	Codificados		
	1	2	3
1	-1,00	-1,00	-1,00
2	-1,00	-1,00	1,00
3	-1,00	1,00	-1,00
4	-1,00	1,00	1,00
5	1,00	-1,00	-1,00
6	1,00	-1,00	1,00
7	1,00	1,00	-1,00
8	1,00	1,00	1,00
9	-1,68	0,00	0,00
10	1,68	0,00	0,00
11	0,00	-1,68	0,00
12	0,00	1,68	0,00
13	0,00	0,00	-1,68
14	0,00	0,00	1,68
15	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00

A etapa *downstream* de produção, onde foi realizado a secagem da biomassa e a extração de seu conteúdo oleoso para a averiguação das melhores cepas produtoras e avaliação da influência das variáveis de cultivo foi feito na estufa de calor a 50°C e as extrações foram feitas através da técnica de Bligh & Dyer (1959) para todos os experimentos.

2.3 Produção de ômega-3 utilizando biorreator STR 10 L

O preparo do inóculo foi realizado em Erlenmeyers de 500 ml, cada um contendo 200 ml de meio GYPS ajustado para um pH de 6,0. Esses frascos foram agitados e incubados durante 48 horas a uma velocidade de 120 rpm e temperatura de 28°C. Utilizou-se um biorreator tipo STR (Stirred Tank Reactor) com capacidade para 10 L (New Brunswick Scientific), equipado com um impelidor padrão, mantendo um volume

operacional de 4 L em todos os biorreatores, garantindo 60% de *headspace*. O estudo comparou a produção sob diferentes condições físico-químicas, enfocando variáveis como aeração e oxigenação, para potencializar o acúmulo de ômega-3.

O inóculo, consistindo de 400 ml (10% v/v) do caldo GYPS contendo as cepas em fase exponencial, foi introduzido no meio de fermentação obtido no planejamento experimental (DCCR), o qual consiste em 8% glicerol, 20 g/L de milhocina e 4 g/L de creme de levedura. O processo biológico foi ajustado para manter a temperatura em 28°C e o pH em 6, com base em otimizações anteriores (COLONIA, B. S. O., 2021). Foram avaliados parâmetros de oxigenação, onde em um reator a agitação foi adaptada entre 200 a 600 rpm conforme a demanda de oxigenação dos microrganismos durante o bioprocessamento, e o outro o processo ocorreu apenas com agitação fornecida por injeção de ar. A formação de espuma foi controlada mediante a adição de antiespumante. Para um monitoramento detalhado da cinética do processo, foram realizadas coletas de alíquotas em intervalos de 24 horas, nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação.

2.4 Técnicas de separação e recuperação

2.4.1 Secagem em estufa

A biomassa obtida nos experimentos foi separada do sobrenadante por meio de centrifugação a 3000 rpm (1660 g) durante 5 minutos (DOYU). Posteriormente, procedeu-se com três lavagens consecutivas usando água deionizada, a fim de eliminar quaisquer resíduos remanescentes de substratos. A biomassa centrifugada recolhida foi então disposta em placas de Petri de vidro, formando camada de biomassa de 1-2 mm de altura, as quais foram alocadas em prateleiras dentro de estufa de secagem com sistema de ventilação, modelo EL402/412. Para o processo de secagem, manteve-se a temperatura em 50°C *overnight*.

2.4.2 Técnicas de extração lipídica

Os lipídios totais foram extraídos e determinados gravimetricamente (BLIGH & DYER, 1959). Foram pesados 0,2 gramas de biomassa seca e 0,8 ml de água destilada, adicionados a um tubo Falcon de 15 ml e homogeneizados em vórtex por 10 s. 1 ml de clorofórmio e 2 ml de metanol foram adicionados e agitados em vórtex durante 2 min. 1 ml de clorofórmio foi adicionado à mistura e agitado em vórtex por 30 s. Em seguida,

adicionou-se 1 ml de água destilada e novamente se agitou por mais 30 s. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 6 min e a alíquota de 1,4 ml da fase inferior, contendo clorofórmio, foi transferida para um frasco previamente pesado. O clorofórmio foi evaporado a 45 °C por 3 h em estufa a vácuo. Os frascos foram resfriados por 15 minutos em dessecador de vidro e pesados novamente para determinar os lipídios de acordo com a Equação 1.

$$\text{Lipídios totais (\%)} = \frac{\text{peso do extrato evaporado (g)} \times \frac{\text{volume de clorofórmio adicionado (mL)}}{\text{volume de alíquota (mL)}}}{\text{peso da biomassa seca (g)}} \times 100\%$$

2.5 Determinações quantitativas

Na cinética realizada em biorreator, a cada intervalo de 24 horas, realizou-se a coleta de alíquotas de 50 mL a partir dos biorreatores com capacidade de 10 L. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 5000 rpm por um período de 5 minutos. Utilizou-se o líquido sobrenadante para aferir o consumo de glicerol ao longo do processo. A biomassa resultante foi empregada para a quantificação do peso seco e da concentração de lipídios. A partir dessas medições, foram calculados parâmetros cinéticos, incluindo a produtividade volumétrica da biomassa, a produtividade volumétrica de lipídios, o rendimento total da biomassa em função do substrato, o rendimento total de lipídios baseado no substrato e o rendimento total de lipídios em relação à biomassa.

2.5.1 Determinação de biomassa seca

A quantificação da biomassa seca ocorreu por meio de um método gravimétrico, empregando a biomassa recolhida pós-centrifugação das amostras. Esta biomassa foi submetida à secagem em uma estufa com circulação de ar e aquecimento a uma temperatura de 50°C durante aproximadamente 24 horas, até a obtenção de peso constante. Após esse processo, procedeu-se à pesagem para determinar o peso seco total. Para o cálculo preciso do peso seco final, foi necessário considerar variáveis como o substrato não metabolizado, o peso seco do inóculo inicial e o teor de umidade. Essas correções foram realizadas por meio da análise do consumo de açúcares utilizando o método DNS, da determinação do teor de umidade e da quantificação do peso seco do inóculo, que envolveu etapas de centrifugação, secagem e técnicas gravimétricas.

Tabela 11 - Equações para os cálculos dos parâmetros cinéticos de crescimento no reator.

Parâmetros cinéticos	Equações
Velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})	$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$
Tempo de geração (d)	$Tg = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}}$
Produtividade máxima de biomassa ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$R_{x_{m\acute{a}x}} = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}$
Produtividade total de biomassa ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$R_{x_{total}} = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}$
Produtividade máxima de consumo de substrato ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$R_{s_{m\acute{a}x}} = \frac{S_1 - S_2}{t_2 - t_1}$
Produtividade total de consumo de substrato ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$R_{s_{total}} = \frac{S_i - S_f}{t_f - t_i}$
Produtividade máxima de formação de produto ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$R_{p_{m\acute{a}x}} = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1}$
Produtividade total de formação de produto ($g.L^{-1}.d^{-1}$)	$R_{p_{total}} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i}$

2.5.2 Determinação do consumo de glicerol

A mensuração do glicerol residual foi efetuada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Previamente à injeção, as amostras passaram por filtragem utilizando filtros Milipore de 0,2 μ m. O aparato de cromatografia consistiu em um HPLC da marca Shimadzu, acoplado a uma coluna HI-PLEX H da Agilent, e integrado a um detector de índice de refração modelo RID-10A. A temperatura da coluna foi sustentada a 60°C, e empregou-se uma solução de ácido sulfúrico 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min como fase móvel.

2.5.3 Perfil dos ácidos graxos

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram produzidos através de transesterificação direta de biomassa celular liofilizada, com o método ajustado de acordo com Chi et al. (2007) e Indarti et al. (2005). Foram utilizados 20 mg de biomassa seca, colocados em tubos de vidro de 16 ml com tampas de PTFE/Teflon. A estes, adicionou-

se 2,0 ml de H₂SO₄ 15% em metanol, seguido de agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos. Posteriormente, incorporou-se 2,0 ml de clorofórmio a mistura, agitando novamente em vórtex, desta vez por 10 segundos. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 90 °C durante 40 minutos, com agitação manual a cada 5 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o conteúdo dos tubos foi transferido para tubos de centrífuga de 15 ml, adicionando-se 1 ml de água milli-Q. Esta mistura foi agitada em vórtex por 45 segundos e, em seguida, centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. As fases líquidas inferiores foram secas em novos tubos contendo sulfato de sódio anidro, agitadas em vórtex por 10 segundos e deixadas em repouso por 15 minutos. As fases orgânicas foram então filtradas através de filtros de 0,22 µm para eliminar impurezas, e os FAMES armazenados em vials de cromatografia, selados e mantidos a -20 °C até a análise por cromatografia gasosa.

A caracterização dos perfis de ácidos graxos foi feita por cromatografia gasosa usando um GC2010 Plus Capilar GC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD), equipado com detector de ionização de chama (FID), injetor automático (AOC-20i) e uma coluna capilar SH-RTX™-Wax (Shimadzu, 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm). A injeção dos FAMES utilizou um volume de 1 µl com uma razão de divisão de 1:10, e o hélio como gás de arraste a uma velocidade linear de 32,5 cm/s. As temperaturas do injetor e do detector FID foram fixadas em 240 °C e 250 °C, respectivamente. O programa de temperatura da coluna começava em 100 °C, mantido por 5 minutos, seguido de um aumento para 240 °C à taxa de 4 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. Os FAMES foram identificados e quantificados comparando os tempos de retenção e as áreas dos picos com o padrão Supelco® 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich, Merck). A análise dos dados cromatográficos foi realizada utilizando o software GCsolution Workstation versão 2.32 (Shimadzu, LabSolutions).

2.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Após a coleta de dados, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey para diferenças entre médias, ambos com nível de significância de 5%. Para os dados otimizados, empregou-se análise de superfície de resposta, também com 5% de significância, utilizando o software Statistic 7.

3. RESULTADOS

3.1 Testes preliminares

Os resultados apresentados na tabela 12 indicam um estudo preliminar para otimizar o cultivo de *Schizochytrium limacinum*. Três tipos de substratos foram testados: glicerol, milhocina e creme de levedura, tanto isoladamente quanto em combinação.

Tabela 12 - Resultados dos testes preliminares, concentração de biomassa e teor de lipídios

Teste	Glicerol (% v/v)	Milhocina (g/L)	Creme de levedura (g/L)	Sal marinho (g/L)	Biomassa (g/L)	Lipídios (g/L)
Milhocina	10	30	-	10	6,11±0,06	13,52±0,18
Creme de levedura	10	-	30	10	5,97±0,08	23,53±0,93
Mix	10	24,5	6	10	6,53±0,07	27,62±0,66

No experimento com milhocina obteve-se uma produção moderada de biomassa e um teor de lipídios mais baixo comparado aos outros. O uso de creme de levedura, apesar de resultar em uma ligeira diminuição na biomassa, aumentou consideravelmente a produção de lipídios. A combinação de milhocina e creme de levedura em proporções específicas no teste Mix levou a uma biomassa ainda maior e o maior teor de lipídios entre os três testes.

Estes resultados sugerem uma sinergia entre os nutrientes fornecidos pela milhocina e o creme de levedura, resultando em uma cultura mais eficiente em termos de produção de lipídios, que são de grande interesse devido ao seu alto valor no mercado de suplementos nutricionais e na aquicultura. Isso está em linha com a literatura que discute o uso de subprodutos e resíduos industriais como substratos econômicos para a cultura de microorganismos como *Schizochytrium limacinum*, visando a produção de DHA.

Os resultados da tabela, que mostram o efeito de diferentes substratos na produção de biomassa e lipídios pelo *Schizochytrium limacinum*, ecoam as descobertas de estudos recentes que abordam a busca por fontes alternativas e sustentáveis de

nutrientes para o cultivo de microalgas. Por exemplo, Bouras et al. (2022) demonstraram que tanto o glicerol cru quanto o digestato de biogás podem ser nutrientes alternativos eficazes no cultivo de *S. limacinum*, otimizando a produção de biomassa e DHA. Isso pode ser paralelo ao uso de milhocina e creme de levedura que, conforme os dados da tabela, contribuem para aumentos significativos na produção de biomassa e lipídios.

Complementarmente, Oliver et al. (2022) confirmaram a viabilidade dos ácidos graxos voláteis derivados de resíduos como fontes de carbono para a produção de biomassa rica em DHA em microalgas, reforçando o potencial dos subprodutos industriais como fontes de nutrientes eficientes (OLIVER et al., 2022). Além disso, o trabalho de Zhang et al. (2022) ofereceu perspectivas valiosas sobre como a manipulação das condições de cultivo, especialmente a composição dos nutrientes, pode influenciar diretamente a produção de DHA (ZHANG et al., 2022).

A partir da análise dos dados da tabela e das referências bibliográficas, torna-se evidente que uma estratégia de nutrição mista pode ser mais vantajosa para maximizar tanto a produção de biomassa quanto de lipídios em microalgas. Essa abordagem está alinhada com a literatura científica que promove o uso de substratos complexos e diversificados para otimizar o crescimento de microorganismos e a síntese de metabólitos desejáveis, como os ácidos graxos poliinsaturados.

Para avançar no Design de Experimentos, um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) seria uma abordagem adequada para determinar as condições ótimas de cultivo, permitindo assim uma avaliação mais aprofundada dos efeitos dos substratos e suas interações sobre o crescimento e a produção de lipídios de *S. limacinum*.

3.2 Planejamento experimental DCCR

Os dados apresentados na tabela 13 refletem um estudo de otimização do processo de produção de biomassa e lipídios em *Schizochytrium limacinum* utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde diferentes concentrações de glicerol, milhocina e creme de levedura foram sistematicamente variadas. O glicerol utilizado para a obtenção destes resultados foi o comercial, onde pode-se observar que as condições com concentrações médias de deste componente, especialmente em combinação com níveis médios a altos de milhocina e creme de levedura, parecem proporcionar uma boa produção tanto de biomassa quanto de lipídios. Entretanto, é notável que as concentrações extremas desses substratos não conduziram

necessariamente aos maiores teores de biomassa ou lipídios, sugerindo que há um equilíbrio delicado nas concentrações dos substratos que maximiza a eficiência do cultivo.

Tabela 13 - Resultados em relação ao teor de lipídios e concentração de biomassa no DCCR com glicerol padrão.

Ensaio	Glicerol (%)	Milhocina (g/L)	Creme de levedura (g/L)	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)
1	8,0 (-1,00)	20,0 (-1,00)	4,0 (-1,00)	8,09	26,38
2	8,0 (-1,00)	20,0 (-1,00)	8,0 (1,00)	8,10	18,14
3	8,0 (-1,00)	29,0 (1,00)	4,0 (-1,00)	8,34	18,92
4	8,0 (-1,00)	29,0 (1,00)	8,0 (1,00)	9,62	21,18
5	12,0 (1,00)	20,0 (-1,00)	4,0 (-1,00)	6,86	12,92
6	12,0 (1,00)	20,0 (-1,00)	8,0 (1,00)	8,10	13,25
7	12,0 (1,00)	29,0 (1,00)	4,0 (-1,00)	8,24	14,18
8	12,0 (1,00)	29,0 (1,00)	8,0 (1,00)	9,51	15,28
9	6,64 (-1,68)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	7,72	24,42
10	13,4 (1,68)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	7,84	11,84
11	10,0 (0,00)	16,9 (-1,68)	6,0 (0,00)	6,69	17,22
12	10,0 (0,00)	36,1 (1,68)	6,0 (0,00)	9,52	16,79
13	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	2,6 (-1,68)	7,90	19,42
14	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	9,4 (1,68)	9,85	20,29
15	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	8,07	14,25
16	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	8,45	16,29
17	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	8,23	24,96

Ao analisar, percebe-se que os ensaios de número 1 e 4, onde a concentração de milhocina foi mantida em 20 g/L, mas com variações no glicerol e creme de levedura, resultaram em altos teores de lipídios. Isto sugere uma interação positiva entre esses componentes para o acúmulo de lipídios. Em contraste, o aumento da milhocina para 36,1 g/L, como no ensaio 12, favoreceu a biomassa, mas não necessariamente os lipídios, o que poderia indicar um desvio do metabolismo da célula para o crescimento celular em detrimento do acúmulo de lipídios.

Esses resultados indicam que não apenas a presença de um determinado substrato é importante, mas também sua concentração específica e a interação com outros componentes do meio de cultivo. Esse tipo de informação é crucial para a indústria de bioprodutos, onde o custo e a eficiência da produção devem ser cuidadosamente balanceados para viabilizar a aplicação comercial dos microorganismos. A capacidade de *S. limacinum* de produzir DHA, um ácido graxo de alto valor, sob diferentes condições de cultivo pode, portanto, ser significativamente melhorada com base em um entendimento aprofundado das necessidades nutricionais do microorganismo e da interação entre os componentes do meio de cultivo.

Na tabela 14 de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), avaliando a produção de biomassa e lipídios pelo *Schizochytrium limacinum*, o uso de glicerol bruto, um resíduo da produção de biodiesel, mostra resultados distintos em comparação com o uso de glicerol padrão da primeira tabela. Os resultados refletem a adaptação do microorganismo às fontes de carbono de diferentes qualidades, o que pode influenciar tanto o crescimento quanto a produção de lipídios.

Observa-se que as condições com glicerol bruto, particularmente nos ensaios iniciais (1 e 2), produziram maior teor de lipídios do que a biomassa, quando comparado com os dados da tabela anterior. Isso pode indicar que o glicerol bruto possui componentes ou impurezas que podem agir como promotores ou inibidores no metabolismo de *Schizochytrium limacinum*, afetando diferentemente a síntese de lipídios e o crescimento celular. O melhor resultado para a produção de lipídios foi observado no Ensaio 1, onde a concentração de glicerol era de 8% e a de milhocina de 20 g/L, com o creme de levedura em 4 g/L, resultando em um teor de lipídios de 28,92%. Este resultado é superior aos outros ensaios e sugere que a combinação de glicerol bruto em concentrações mais baixas, com quantidades moderadas de milhocina e uma menor quantidade de creme de levedura, pode ser mais propícia para a acumulação de lipídios no *Schizochytrium limacinum*.

A obtenção de um alto teor lipídico é particularmente relevante quando o objetivo é a produção de compostos de alto valor, como os ácidos graxos ômega-3, em particular o DHA, que são aplicados em suplementos nutricionais e em rações aquáticas. A utilização do glicerol bruto, que é um subproduto mais econômico em comparação ao glicerol padrão, pode oferecer um benefício econômico significativo para a produção em larga escala, desde que as impurezas presentes no glicerol bruto não afetem negativamente o processo de cultivo e a qualidade do produto final.

É importante destacar que, embora o Ensaio 1 tenha apresentado o melhor perfil lipídico, a otimização do processo requer uma avaliação criteriosa dos custos e dos benefícios associados. Aspectos como o custo dos diferentes substratos, o potencial tóxico de impurezas no glicerol bruto e a qualidade final dos lipídios produzidos precisam ser considerados para assegurar a viabilidade industrial do processo.

Tabela 14 - Resultados em relação ao teor de lipídios e concentração de biomassa no DCCR com glicerol bruto.

Ensaio	Glicerol (%)	Milhocina (g/L)	Creme de levedura (g/L)	Biomassa (g/L)	Lipídios (%)
1	8,0 (-1,00)	20,0 (-1,00)	4,0 (-1,00)	7,06	28,92
2	8,0 (-1,00)	20,0 (-1,00)	8,0 (1,00)	7,19	19,32
3	8,0 (-1,00)	29,0 (1,00)	4,0 (-1,00)	8,03	20,13
4	8,0 (-1,00)	29,0 (1,00)	8,0 (1,00)	8,15	19,18
5	12,0 (1,00)	20,0 (-1,00)	4,0 (-1,00)	3,57	8,30
6	12,0 (1,00)	20,0 (-1,00)	8,0 (1,00)	4,45	7,64
7	12,0 (1,00)	29,0 (1,00)	4,0 (-1,00)	4,15	6,36
8	12,0 (1,00)	29,0 (1,00)	8,0 (1,00)	4,72	6,58
9	6,64 (-1,68)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	7,84	23,52
10	13,4 (1,68)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	4,59	6,05
11	10,0 (0,00)	16,9 (-1,68)	6,0 (0,00)	5,43	14,21
12	10,0 (0,00)	36,1 (1,68)	6,0 (0,00)	8,78	13,72
13	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	2,6 (-1,68)	5,61	18,98
14	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	9,4 (1,68)	6,08	7,96
15	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	5,58	14,67
16	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	7,55	11,79
17	10,0 (0,00)	24,5 (0,00)	6,0 (0,00)	2,75	18,07

Em termos de literatura, os resultados estão alinhados com estudos como o de Pyle et al. (2008), que examinaram o impacto da qualidade do glicerol no cultivo de microalgas, e Patel et al. (2019), que exploraram diferentes substratos para otimizar a produção de lipídios em microalgas (PATEL et al., 2019). Ambos os estudos destacam que a seleção e a concentração de substratos são fundamentais para o rendimento de

lipídios e que o glicerol, mesmo o de menor pureza, pode ser uma fonte de carbono eficaz para a produção de lipídios por microorganismos.

A variação das concentrações de glicerol bruto, milhocina e creme de levedura nesta tabela também parece mostrar um perfil de resposta diferente do observado com o glicerol padrão. Enquanto na primeira tabela o aumento da concentração de milhocina levou a um aumento na produção de biomassa, nesta tabela a tendência não é tão clara. No entanto, o ensaio 12 com a mais alta concentração de milhocina (36,1 g/L) e concentração padrão de glicerol (10%) resultou na maior produção de biomassa (8,78 g/L), sugerindo que a qualidade do glicerol pode influenciar a capacidade de *Schizochytrium limacinum* em utilizar eficientemente a milhocina.

O conhecimento de que o glicerol bruto foi usado aqui também traz implicações para a sustentabilidade do processo. A utilização de um resíduo da produção de biodiesel como glicerol bruto para cultivar *Schizochytrium limacinum* se alinha com esforços para criar bioprocessos mais verdes e econômicos, que valorizam subprodutos e diminuem o custo de produção.

Estudos similares têm investigado o uso de glicerol, incluindo glicerol bruto, como um substrato para o crescimento de microorganismos. Por exemplo, a pesquisa de Chatzifragkou et al. (2011) demonstrou que o glicerol derivado da produção de biodiesel pode ser uma fonte de carbono econômica e eficaz para a produção de metabólitos por microorganismos. Da mesma forma, Athalye et al. (2009) exploraram o potencial do glicerol bruto em bioprocessos, indicando que impurezas presentes no glicerol bruto podem afetar a viabilidade celular e a produção de metabólitos.

Essas nuances na utilização de substratos de diferentes qualidades destacam a complexidade dos bioprocessos e a necessidade de um entendimento aprofundado das interações entre o microorganismo e o meio de cultivo. Os resultados indicam que a otimização da produção de biomassa e lipídios em *S. limacinum* pode beneficiar-se do ajuste fino das concentrações dos substratos e da qualidade do glicerol utilizado.

Levando em consideração os resultados obtidos nos ensaios apresentados na tabela 15, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para avaliar o impacto estatístico das concentrações dos substratos na produção lipídica por *Schizochytrium limacinum*. A ANOVA possibilitou identificar que as menores quantidades de substratos, especificamente as condições do Ensaio 1, levaram à maior concentração lipídica (Figura 7). Com base nessa descoberta, decidiu-se proceder com um reator de maior volume para realizar um estudo de cinética em batelada.

Figura 7 - Superfície de resposta do DCCR com glicerol bruto

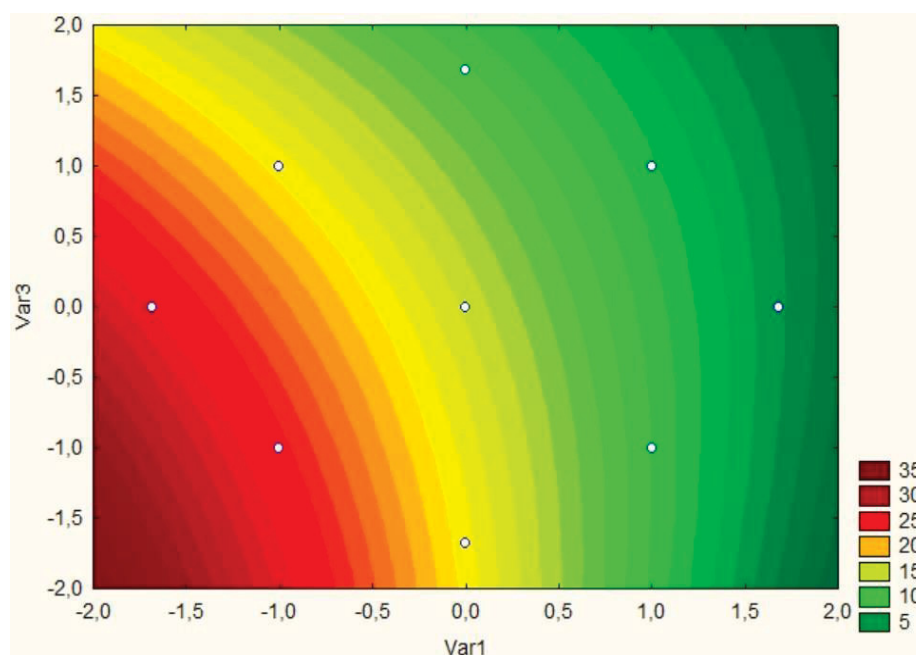


Tabela 15 - ANOVA do DCCR com glicerol bruto.

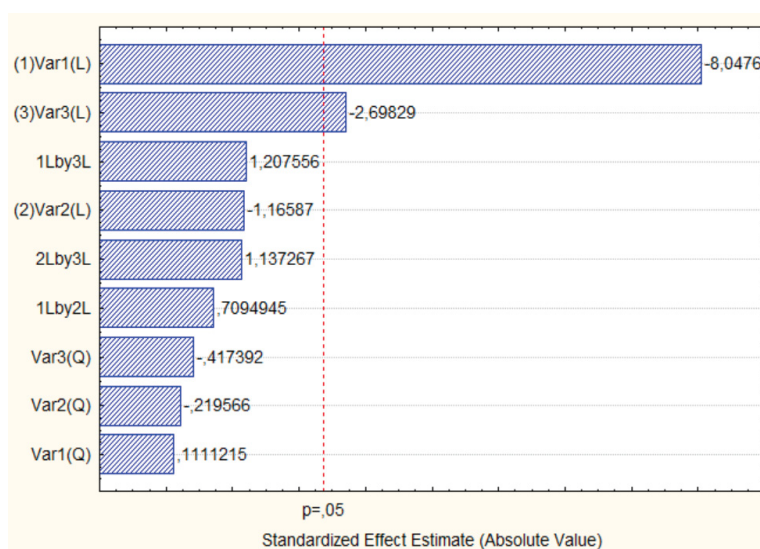
Fatores	Coefficientes de regressão	Erro puro	t (7)	p-valor
Média*	14,80823	1,705685	8,68169	0,000054
Glicerol (L)*	-6,44624	0,801004	-8,04769	0,000088
Glicerol (Q)	0,09797	0,881622	0,11112	0,914639
Milhocina (L)	-0,93387	0,801004	-1,16587	0,281850
Milhocina (Q)	-0,19357	0,881622	-0,21957	0,832475
Levedura (L)*	-2,16134	0,801004	-2,69829	0,030715
Levedura (Q)	-0,36798	0,881622	-0,41739	0,688896
1.2	0,74253	1,046562	0,70949	0,500960
1.3	1,26378	1,046562	1,20756	0,266431
2.3	1,19022	1,046562	1,13727	0,292853

OBS: Os itens marcados com (*) demonstram os fatores que demonstraram diferença significativa.

O gráfico de Pareto (figura 8) fornece insights significativos para a otimização da produção de lipídios em *Schizochytrium limacinum*, indicando que tanto a quantidade de glicerol quanto o creme de levedura são os fatores com maior impacto neste processo. A análise revela que mudanças na concentração de glicerol, que é o resíduo da produção

de biodiesel e, portanto, um recurso mais sustentável, têm o maior efeito padronizado na produção lipídica, o que sugere uma relação direta e significativa entre a concentração de glicerol e o rendimento de lipídios. Por sua vez, o creme de levedura também demonstra ser um fator relevante, mas com um impacto menor em comparação ao glicerol.

Figura 8 - Diagrama de pareto para o DCCR com glicerol bruto.



A escolha desse método para a próxima etapa do estudo é estratégica, pois a cinética em batelada permite monitorar a produção de lipídios e o crescimento de biomassa em condições definidas sem a complexidade adicional da alimentação contínua ou intermitente de substratos, o que poderia influenciar a homogeneidade do meio e a reprodução dos resultados. Esta abordagem simplificada permite uma análise mais clara e controlada do comportamento do *Schizochytrium limacinum* sob as condições que, segundo a ANOVA, são mais promissoras para a síntese de lipídios.

Além disso, o escalonamento para um reator de maior volume é um passo crítico para aproximar as condições laboratoriais da produção em escala industrial, fornecendo informações valiosas sobre o desempenho do processo em um ambiente que simula melhor as instalações de produção real. A operação em maior escala também pode revelar desafios como o controle de parâmetros físicos, como oxigenação e mistura, que são críticos para a produção otimizada de biomassa e lipídios e podem não ser tão evidentes em escala de laboratório.

3.3 Cinética em reator

A tabela 16 apresenta um conjunto de dados que ilustra a influência de diferentes condições de cultivo sobre a produtividade e o crescimento de *Schizochytrium limacinum*, um microrganismo marinho produtor de ácidos graxos ômega-3.

Tabela 16 - Parâmetros cinéticos avaliados no cultivo em reator.

Condição	$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	$R_{x\text{total}}$ (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	T_g (d)	R_s total (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	R_s máx (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	R_p total (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	R_p máx (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
Agitação pneumática	10,91	0,75	2,18	0,92	14,33	22,79	3,10	5,42
Aeração mecânica	7,63	0,50	1,29	1,39	11,33	17,44	7,96	14,51

A concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), que indica a densidade máxima de células alcançada, foi mais alta sob agitação pneumática com 10,91 g.L⁻¹ do que sob aeração mecânica, que atingiu 7,63 g.L⁻¹. Esse fenômeno pode ser atribuído a uma maior disponibilidade de nutrientes e menor estresse por cisalhamento em sistemas com agitação sem a utilização de impelidores.

A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) é significativamente superior sob aeração pneumática, alcançando 0,75 d⁻¹, em comparação com 0,50 d⁻¹ na agitação mecânica. Esse aumento pode ser atribuído à maior eficiência na transferência de oxigênio para as células sob aeração pneumática, que é crítica para o metabolismo energético e crescimento celular, como indicado por Ren et al. (2010), que exploraram a aeração como um fator chave para otimizar a produção de DHA em *Schizochytrium sp.* (REN et al., 2010).

A produtividade total de biomassa ($R_{x\text{total}}$), refletindo a massa total de células produzida por volume de cultura ao longo do tempo, foi maior sob aeração pneumática com 2,18 g.L⁻¹.d⁻¹ em comparação com 1,29 g.L⁻¹.d⁻¹ na agitação mecânica. Ethier et al. (2011) mostraram que condições otimizadas de aeração podem melhorar significativamente a produção de biomassa em culturas contínuas de *Schizochytrium limacinum* (ETHIER et al., 2011).

O tempo de duplicação de células (T_g), que indica o período necessário para que a população de células dobre de tamanho, foi mais curto sob aeração pneumática (0,92

dias) do que na agitação mecânica (1,39 dias). Este resultado sugere uma taxa de crescimento celular mais eficiente, possivelmente devido a uma melhor disponibilidade de oxigênio e nutrientes. A pesquisa de Talbierz et al. (2022) suporta a ideia de que ajustes nas condições de cultivo, como a aeração, podem levar a uma taxa de crescimento mais rápida e acumulação eficaz de lipídios em *Schizochytrium limacinum* (TALBIERZ et al., 2022b).

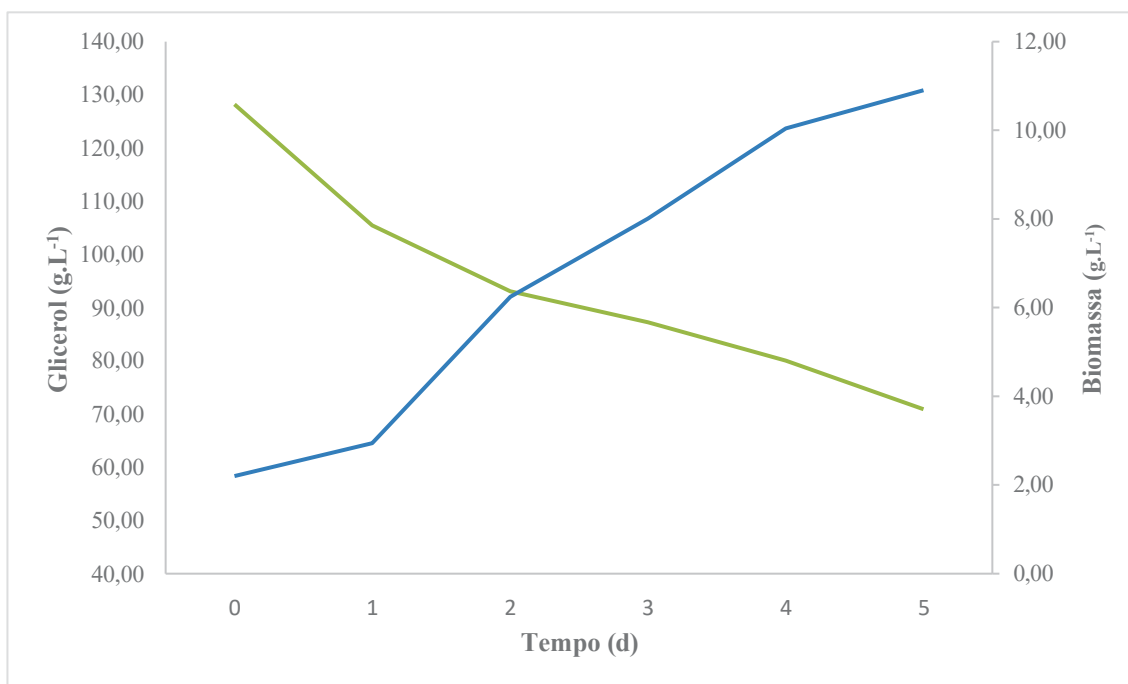
A produtividade total do consumo de substrato ($R_{s \text{ total}}$) foi menor na aeração mecânica ($11,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) em comparação com a agitação pneumática ($14,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), sugerindo uma utilização mais eficiente de nutrientes sob a condição de aeração. Da mesma forma, a produtividade máxima do consumo de substrato ($R_{s \text{ máx}}$) foi maior sob aeração pneumática ($22,79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) do que na agitação mecânica ($17,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), o que pode indicar um metabolismo mais ativo durante o crescimento exponencial, como observado por Bouras et al. (2022) (BOURAS et al., 2022).

Finalmente, a formação total de produtos ($R_{p \text{ total}}$) e a produtividade máxima de formação de produto ($R_{p \text{ máx}}$) foram ambas maiores na aeração mecânica, com valores de $7,96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ e $14,51 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. Isso pode ser associado com uma maior eficiência na biossíntese de lipídios, onde uma aeração adequada desempenha um papel crítico no acúmulo de lipídios, uma observação corroborada pelo estudo de Liang et al. (2010) que ressalta a relação entre a disponibilidade de oxigênio e a produção de lipídios (LIANG et al., 2010).

Essa análise demonstra que a estratégia de aeração desempenha um papel crítico na otimização do cultivo de *Schizochytrium limacinum*, impactando todos os aspectos do crescimento e produtividade, e destaca a necessidade de ajustes finos nas condições de cultivo para maximizar a produção de biomassa e lipídios.

A Figura 9 ilustra a dinâmica de consumo de glicerol em relação ao crescimento de biomassa em um reator com aeração pneumática ao longo de um período de cinco dias. Observamos duas curvas: a curva descendente representa o consumo acumulado de glicerol, enquanto a curva ascendente reflete o crescimento da biomassa de *Schizochytrium limacinum*.

Figura 9 - Curva de consumo de substrato em relação ao crescimento de biomassa, no reator com aeração pneumática



Inicialmente, a biomassa é baixa, indicando o início do cultivo. Ao longo do tempo, a biomassa aumenta consistentemente, o que é típico de uma fase exponencial de crescimento celular. Durante esse período, as células estão metabolicamente ativas e consomem o substrato para crescer e se dividir. A taxa de crescimento pode ser atribuída à adaptação das células ao ambiente de cultivo e à eficiência na utilização do substrato para a síntese de novas células.

A curva de consumo de glicerol diminui com o tempo, o que indica que à medida que as células crescem, mais substrato é consumido. Inicialmente, o consumo de substrato é mais lento, possivelmente devido à fase lag de crescimento, onde as células ainda estão se adaptando ao meio de cultivo. À medida que as células entram na fase exponencial, o consumo de glicerol aumenta rapidamente, refletindo uma maior demanda energética e metabólica das células em divisão.

Ao final dos cinco dias, a quantidade de glicerol consumido é maior do que a biomassa produzida. Isso pode sugerir que, além da biomassa celular, o glicerol pode estar sendo direcionado para a produção de outros metabólitos, como os lipídios, que são produtos de valor agregado gerados por *Schizochytrium limacinum*. A diferença entre a taxa de consumo de glicerol e a taxa de crescimento da biomassa pode ser explicada pela

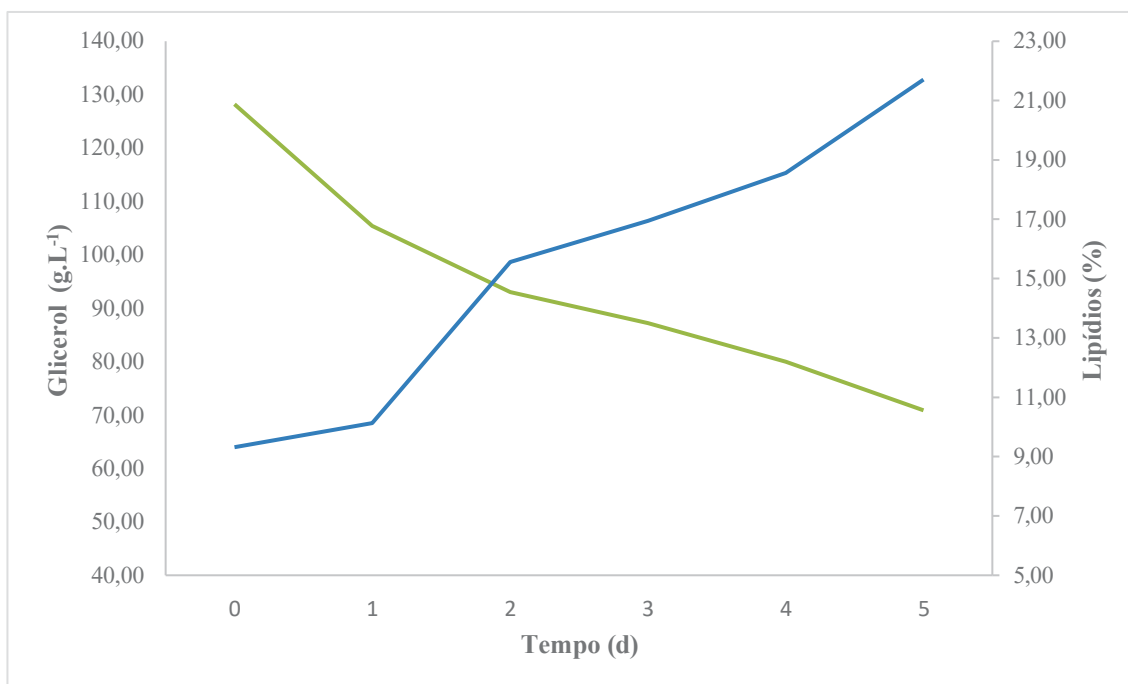
eficiência metabólica da cultura, que não necessariamente converte todo substrato consumido diretamente em crescimento celular.

Estudos como o de Ethier et al. (2011) mostraram a viabilidade de *Schizochytrium limacinum* crescer em glicerol, utilizando-o eficientemente para produção de biomassa e DHA, um ácido graxo de cadeia longa. Eles investigaram o cultivo contínuo de *Schizochytrium limacinum* em glicerol derivado de biodiesel, analisando a cinética de crescimento celular, eficiência na utilização do substrato e produção de DHA. Este estudo determinou que a máxima taxa de crescimento específico foi de 0.692 d^{-1} e que a maior produtividade de biomassa de $3,88 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ foi alcançada com uma taxa de diluição de $0,3 \text{ d}^{-1}$ e concentração de glicerol de 60 g L^{-1} , enquanto a produtividade máxima de DHA ($0,52 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi obtida com a mesma taxa de diluição e concentração de glicerol de 90 g L^{-1} (ETHIER et al., 2011).

Ao comparar a curva da imagem com os resultados do estudo de Ethier et al. (2011), podemos inferir que um manejo otimizado do processo de fermentação, considerando a taxa de diluição e concentrações adequadas de glicerol, poderia potencialmente aumentar a eficiência do uso do substrato e a produção de biomassa e DHA. Isso destaca a importância do design do processo e controle de condições para maximizar a produção de biomassa e DHA, especialmente quando se utiliza glicerol, um subproduto da produção de biodiesel, como substrato.

A Figura 10 apresenta um perfil do consumo de substrato (glicerol) em relação à produção de lipídios em *Schizochytrium limacinum* cultivado em reator com aeração pneumática ao longo de cinco dias. Neste gráfico, a curva azul, ascendente, mostra o aumento do percentual de lipídios ao longo do tempo, enquanto a curva verde, descendente, indica a quantidade de glicerol consumido.

Figura 10 - Curva de consumo de substrato em relação à produção de lipídios, no reator com aeração pneumática



Pode-se observar que, à medida que o glicerol é consumido, o conteúdo lipídico dentro das células aumenta, sugerindo que o microrganismo está utilizando o glicerol não apenas para crescimento e manutenção celular, mas também para a produção de lipídios, que são armazenados internamente. Este comportamento é típico de organismos oleaginosos, que sob condições de estresse ou limitação de nutrientes, acumulam lipídios como reserva energética.

Ao relacionar esses dados com o estudo realizado por Talbierz et al. (2022), que examinou o efeito do etil metano sulfonato (EMS) sobre as taxas de crescimento e acumulação de lipídios intracelulares em *Schizochytrium limacinum* cultivado em glicerol residual, encontramos algumas semelhanças. O estudo de Talbierz et al. também destacou a importância das condições do processo, tais como temperatura e concentração de glicerol, para otimizar o crescimento e a produção de lipídios (TALBIERZ et al., 2022b). Eles descobriram que ajustes específicos nas condições de cultivo poderiam levar a taxas melhoradas de síntese de lipídios, o que é consistente com as tendências mostradas na Figura 12.

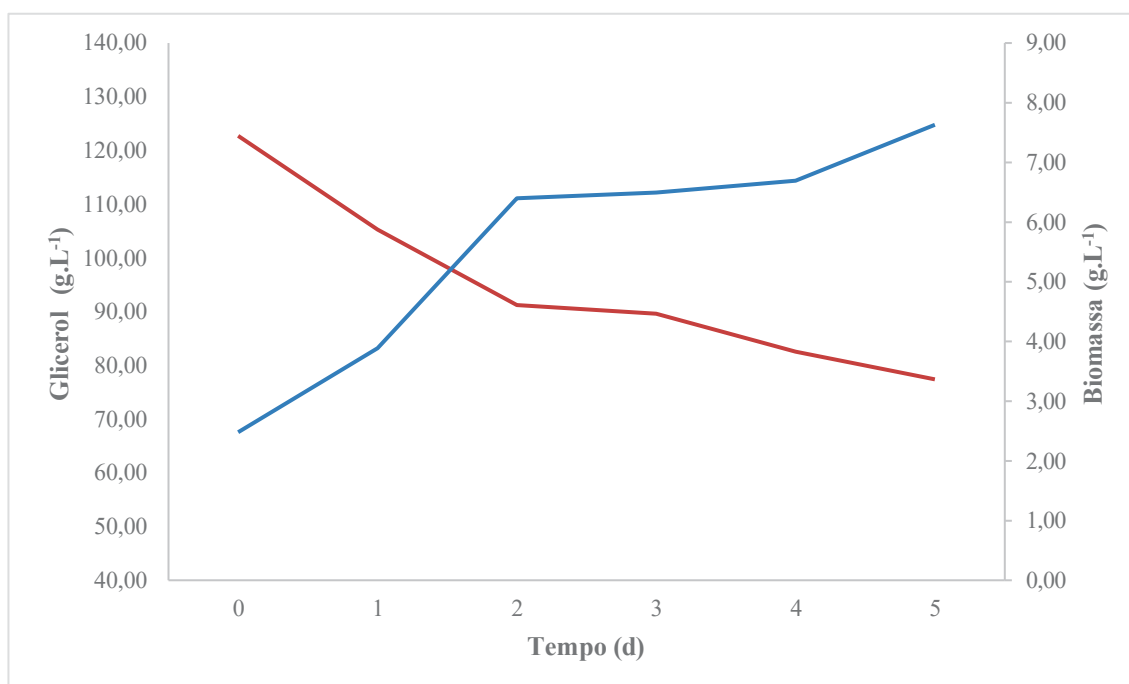
A curva da Figura 10 também pode ser comparada com um estudo semelhante de Ren et al. (2010), que investigou a eficácia da produção de DHA por *Schizochytrium sp.* usando um sistema de controle de aeração em etapas. Este estudo mostrou que uma estratégia de controle de aeração cuidadosa poderia maximizar a produção de biomassa e

DHA, o que pode ser paralelo ao aumento da produção de lipídios observado conforme o consumo de glicerol aumenta (REN et al., 2010).

Ambos os estudos realçam a complexidade e a importância de um design de processo cuidadoso e controle preciso das condições de cultivo para maximizar tanto o crescimento da biomassa quanto a acumulação de lipídios em *Schizochytrium limacinum*. Aumentos graduais no teor de lipídios, como mostrado no gráfico, destacam o potencial do glicerol como um substrato de baixo custo para a produção eficiente de lipídios por este microrganismo.

A Figura 11 mostra o perfil de consumo de substrato (glicerol) em relação ao crescimento de biomassa em um reator com agitação mecânica. O gráfico apresenta duas curvas: a curva azul, que representa a biomassa, mostra um crescimento inicial rápido, seguido de uma fase de crescimento mais lento, enquanto a curva vermelha, que indica o consumo de glicerol, declina ao longo do tempo.

Figura 11 - Curva de consumo de substrato em relação ao crescimento de biomassa, no reator com aeração mecânica



O crescimento inicial rápido da biomassa, seguido por um aumento mais gradual, sugere que a cultura passou pela fase lag rapidamente e entrou na fase exponencial de crescimento, onde as células estão se dividindo ativamente. No entanto, o crescimento mais lento da biomassa após o segundo dia pode ser indicativo de que a cultura pode estar entrando na fase estacionária ou que fatores limitantes, como a depleção de nutrientes ou

acúmulo de metabólitos tóxicos, podem estar começando a afetar o crescimento das células.

Em relação ao consumo de glicerol, a redução contínua sugere que o substrato está sendo eficientemente utilizado ao longo do tempo para sustentar o crescimento da biomassa e, potencialmente, para outros processos metabólicos, como a produção de lipídios ou outros metabólitos secundários.

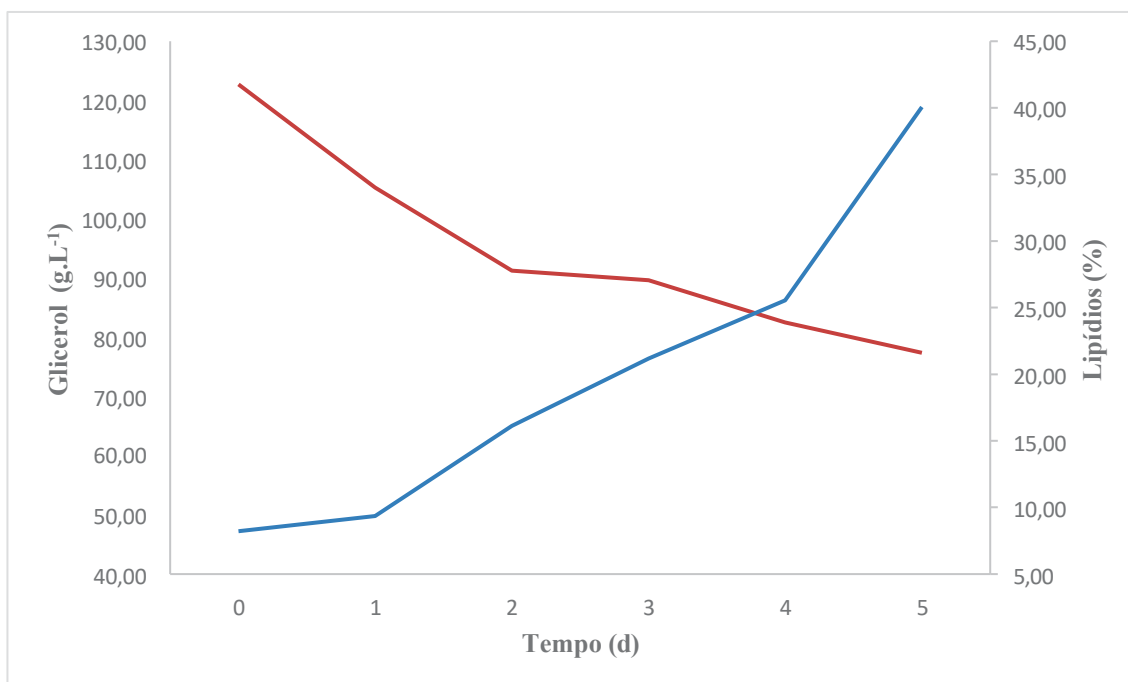
A comparação com o estudo de Bindea et al. (2018), que examinou a otimização das condições de cultivo para maximizar a produção de DHA e β -caroteno por *Schizochytrium limacinum* e *Blakeslea trispora*, respectivamente, em um meio de fermentação, pode oferecer insights adicionais. Esse estudo encontrou que diferentes concentrações de glicerol e temperatura foram parâmetros influentes na fermentação para produção de DHA e β -caroteno. Os resultados destacaram que o controle preciso da temperatura e a concentração do substrato são essenciais para a eficácia da produção de biomassa e metabólitos desejados (BINDEA et al., 2018).

A Figura 12 exibe a relação entre o consumo de substrato e a produção de lipídios em *Schizochytrium limacinum* quando cultivado em um reator com agitação mecânica. A curva azul, que demonstra a produção de lipídios, mostra um aumento significativo após o início do cultivo, sugerindo uma biossíntese de lipídios eficiente. Em contrapartida, a curva vermelha, representando o consumo de glicerol, decresce, indicando que o glicerol está sendo consumido ao longo do tempo.

A elevação na produção de lipídios pode ser associada a uma fase de crescimento onde o microrganismo está direcionando sua maquinaria metabólica para a acumulação de lipídios, um traço comum em microrganismos oleaginosos sob certas condições de estresse ou quando em excesso de carbono. Essa observação é alinhada com o estudo de Talbierz et al. (2022), que relatou uma otimização da produção de lipídios em *Schizochytrium limacinum* utilizando um processo de cultivo em duas etapas, considerando diferentes temperaturas e níveis de glicerol para o crescimento da biomassa e acumulação de lipídios (TALBIERZ et al., 2022b).

Além disso, Liang et al. (2010) investigaram o crescimento e a produção de lipídios em *Schizochytrium limacinum* SR21 utilizando glicerol derivado de gordura animal e encontraram que o conteúdo lipídico atingiu o mais alto valor de 73,3% com a concentração de glicerol de 35 g/L, reforçando a capacidade da alga em acumular lipídios sob concentrações específicas de substrato (LIANG et al., 2010).

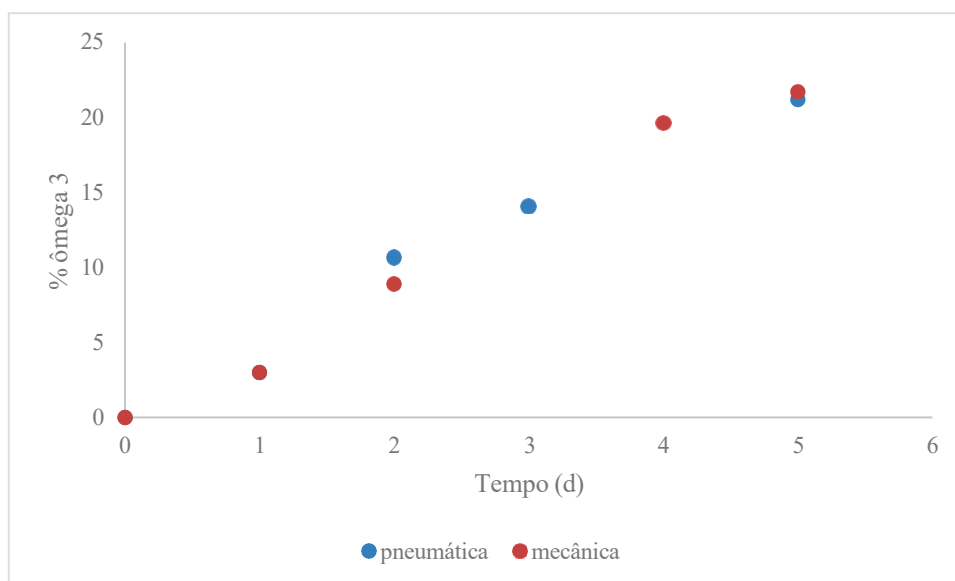
Figura 12 - Curva de consumo de substrato em relação à produção de lipídios, no reator com aeração mecânica



A análise da Figura 12 e a comparação com esses estudos sugerem que a agitação mecânica pode ser eficaz para promover tanto o crescimento quanto a produção de lipídios em *Schizochytrium limacinum* quando combinada com um controle rigoroso das condições de cultivo, incluindo a concentração de substrato e oxigenação. Isso sublinha a importância de um planejamento cuidadoso do processo de bioprodução para alcançar a máxima eficiência produtiva.

A porcentagem de produção de ômega 3 (DHA) pode ser visualizada na figura 13. Onde é possível verificar que durante as fermentações não houve grande diferença na produção total deste composto. Entretanto, ao compararmos com a produção de lipídios obtida no reator com agitação mecânica, que foi superior a 40 %, é possível verificar que a melhor condição para obtenção deste biocomposto de alto valor agregado é com maior agitação, fornecida de acordo com a demanda bioquímica de oxigênio.

Figura 13 - Produção de ômega 3 nos reatores com agitações pneumática e mecânica

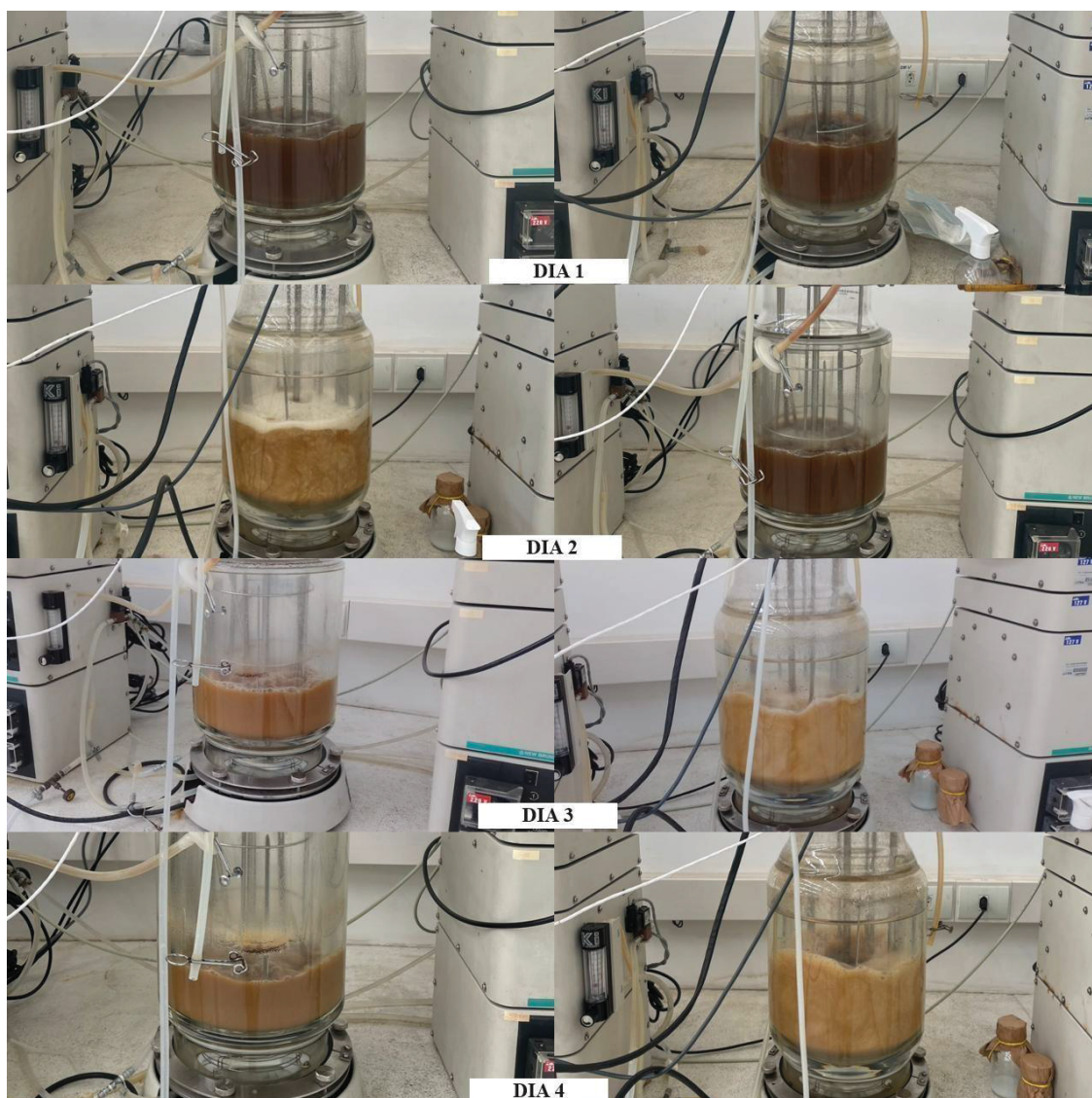


As mudanças visuais observadas nos reatores ao longo dos quatro dias estão provavelmente relacionadas às fases do processo de cultivo de *Schizochytrium limacinum* e correspondem aos valores quantitativos de crescimento, produtividade e outras métricas discutidas anteriormente (Figura 14).

No primeiro, a cor escura pode ser devido à concentração inicial de glicerol ou outro meio de cultivo que ainda não foi metabolizado pelas células. Isso é consistente com os valores iniciais de biomassa e lipídios que seriam relativamente baixos, como seria esperado no início do cultivo, onde a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a produtividade ($R_{X_{\text{total}}}$, $R_{p_{\text{total}}}$) estão apenas começando a aumentar.

À medida que avança para o segundo dia, a formação de uma camada mais clara na parte superior do reator sugere um aumento na densidade da biomassa, o que é coerente com o aumento da produtividade total de biomassa e a diminuição do tempo de duplicação de células (T_g). Isso indicaria que o processo de cultivo está na fase exponencial de crescimento, o que é reforçado pelos dados experimentais que mostram uma produtividade de biomassa aumentada e tempos de duplicação reduzidos.

Figura 14 - Mudança visual dos reatores durante o processo.



No terceiro dia, a definição ainda maior da camada superior e a possível claridade do meio podem indicar um acúmulo ainda maior de biomassa e lipídios, como evidenciado pelo aumento contínuo na produtividade máxima de formação de produto (R_p máx) e pela redução de substrato residual no reator. Isso sugere um consumo eficiente do glicerol e a produção correspondente de lipídios.

Finalmente, no quarto dia, a separação de fases se torna ainda mais evidente, com a parte inferior do reator mostrando maior clareza. Isso pode sinalizar que o cultivo está se aproximando da fase estacionária, onde o crescimento celular desacelera ou para devido à exaustão de nutrientes ou ao acúmulo de metabólitos inibitórios, o que poderia ser refletido em uma desaceleração ou estabilização dos valores de produtividade.

A correlação entre as mudanças visuais nos reatores e os dados experimentais reforça a compreensão de que as condições de cultivo, incluindo a agitação mecânica e a aeração, são cruciais para a otimização do crescimento e da produção de biomassa e lipídios em *Schizochytrium limacinum*. Os valores obtidos na tabela 15 representam quantitativamente o que está sendo visualmente observado nos reatores ao longo do tempo.

4. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que as condições de cultivo têm um impacto significativo na eficiência de *Schizochytrium limacinum* para converter glicerol em biomassa e lipídios. A aeração mecânica, especificamente, desempenhou um papel fundamental na otimização tanto do crescimento celular quanto da produção de lipídios. Os experimentos destacaram uma correlação direta entre o consumo de glicerol e a síntese de lipídios, com as condições de aeração mecânica favorecendo a produção de lipídios de até 40% da biomassa seca. Este resultado é particularmente relevante, considerando que a produção de lipídios em sistemas de agitação mecânica pode ser otimizada por meio do controle de parâmetros de processo como concentração de substrato e níveis de oxigenação.

Os resultados obtidos nesses estudos fornecem informações relevantes para o desenho de processos industriais visando a produção sustentável e econômica de DHA e outros lipídios de cadeia longa por meio da fermentação de *Schizochytrium limacinum*, utilizando glicerol, um subproduto da indústria de biodiesel, como substrato de baixo custo. O equilíbrio entre as condições de cultivo e a eficiência metabólica é essencial para maximizar a produção de biomassa e de lipídios, elementos centrais para a indústria de nutracêuticos e biocombustíveis.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSÃO GERAL

A promoção da economia circular, focando na valorização de resíduos de biodiesel e agroindustriais, representa um avanço significativo no campo da sustentabilidade e da inovação tecnológica. O desenvolvimento de estratégias inovadoras para a transformação desses resíduos em recursos valiosos reflete um compromisso crescente com a eficiência econômica e a responsabilidade ambiental. A investigação dessas estratégias revelou potenciais notáveis na otimização de processos biotecnológicos e no desenvolvimento de novos produtos, sublinhando a interseção vital entre a ciência e a aplicabilidade prática na abordagem dos desafios ambientais contemporâneos.

A autólise de leveduras emergiu como um método promissor, destacando-se pela sua capacidade de enriquecer a biomassa residual e fomentar a geração de produtos de valor agregado. Tal abordagem não só oferece uma solução pragmática para o manejo de resíduos, mas também atua como um catalisador para a inovação sustentável, alinhando-se perfeitamente com os princípios da economia circular.

A avaliação da eficácia e viabilidade técnico-econômica da utilização de diversos efluentes agroindustriais como substratos para o cultivo de microalgas uma estratégia eficaz e economicamente viável para a produção otimizada de biocombustíveis, como biodiesel, bioetanol e biohidrogênio. Esse método não apenas reduz os custos de cultivo, mas também contribui para a mitigação de problemas ambientais relacionados ao descarte de resíduos, alinhando-se com objetivos de sustentabilidade e economia circular. Portanto, essa abordagem oferece uma solução promissora para avançar em direção a um futuro energético sustentável.

A exploração da viabilidade de produzir ácidos graxos ômega-3 a partir de *Schizochytrium limacinum*, utilizando substratos derivados de resíduos, destaca a convergência entre sustentabilidade ambiental e avanços na saúde e nutrição, enfatizando a necessidade de soluções que abordem múltiplas facetas da sustentabilidade.

Em resumo, a valorização de resíduos de biodiesel e agroindustriais através de abordagens inovadoras evidencia um caminho promissor para a economia circular, demonstrando como a ciência e a tecnologia podem ser alavancadas para criar soluções sustentáveis que beneficiem tanto o meio ambiente quanto a economia. Esses avanços reforçam a viabilidade de práticas circulares e sustentáveis como pilares para o desenvolvimento futuro, alinhando inovação tecnológica com responsabilidade ecológica.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. **Exploração de Novos Substratos:** Investigar a aplicabilidade de outros resíduos agroindustriais e de biodiesel como substratos para a produção de microorganismos ou para a síntese de compostos de alto valor, ampliando o escopo da matéria-prima utilizada e avaliando a eficácia de diferentes tipos de resíduos.
2. **Aprimoramento das Técnicas de Autólise:** Desenvolver e otimizar métodos de autólise mais eficientes, que possam aumentar o rendimento e a qualidade dos produtos derivados, explorando diferentes condições enzimáticas, tempos de reação e parâmetros de processamento.
3. **Escala Industrial e Viabilidade Econômica:** Escalar os processos biotecnológicos estudados para aplicações industriais, avaliando a viabilidade econômica, os desafios operacionais e o impacto ambiental em uma escala maior, para entender melhor as implicações práticas da implementação dessas tecnologias.
4. **Desenvolvimento de Produtos Inovadores:** Criar novos produtos a partir dos resíduos valorizados, como biomateriais, bioplásticos, ou bioquímicos especializados, que possam ter aplicações em diversos setores, como medicina, agricultura, ou indústria de embalagens.
5. **Análise do Ciclo de Vida:** Realizar estudos de análise do ciclo de vida (ACV) para avaliar o impacto ambiental total dos processos e produtos desenvolvidos, desde a matéria-prima até o descarte final, garantindo uma compreensão abrangente da sustentabilidade do sistema proposto.
6. **Integração de Sistemas:** Investigar a integração de sistemas de cultivo de microorganismos com outras operações agroindustriais ou de biodiesel, como a criação de sistemas fechados que possam utilizar resíduos de uma operação como insumos para outra, promovendo sinergias e eficiência circular.
7. **Avaliação da Segurança e Regulamentação:** Estudar as implicações de segurança, saúde e regulamentações associadas ao uso de resíduos agroindustriais

para a produção de novos produtos, assegurando que todas as práticas estejam em conformidade com as normas vigentes e sejam seguras para a implementação em escala comercial.

8. **Desenvolvimento Sustentável e Impacto Social:** Avaliar o impacto socioeconômico dos processos de valorização de resíduos, considerando como essas tecnologias podem contribuir para o desenvolvimento sustentável, a criação de empregos, a redução da pobreza e a melhoria das condições locais.

CAPÍTULO V

- ABE, K. et al. Autolysis-mediated membrane vesicle formation in *Bacillus subtilis*. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 2632–2647, 1 maio 2021.
- ABINA, A. et al. **Review of Bioplastics Characterisation by Terahertz Techniques in the View of Ensuring a Circular Economy** *Photonics* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2023.
- AGBOOLA, J. O. et al. Yeast as a novel protein source - Effect of species and autolysis on protein and amino acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 546, 2022a.
- AGBOOLA, J. O. et al. Yeast as a novel protein source - Effect of species and autolysis on protein and amino acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 546, 15 jan. 2022b.
- AHUJA, V. et al. **Yeast-Mediated Biomass Valorization for Biofuel Production: A Literature Review** *Fermentation* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2023.
- AL-DAILAMI, A. et al. Potential of Photobioreactors (PBRs) in Cultivation of Microalgae. **Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology**, v. 27, n. 1, p. 32–44, 1 jun. 2022.
- ALVES, E. M.; DE SOUZA, J. F.; DE OLIVA NETO, P. Advances in yeast autolysis technology - A faster and safer new bioprocess | Avanços na tecnologia de autólise de levedura – um novo bioprocesso mais rápido e seguro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, 2021a.
- ALVES, E. M.; DE SOUZA, J. F.; DE OLIVA NETO, P. Advances in yeast autolysis technology - A faster and safer new bioprocess. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, 2021b.
- ALVES, E. M.; DE SOUZA, J. F.; DE OLIVA NETO, P. Advances in yeast autolysis technology - A faster and safer new bioprocess. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, 2021c.
- AMORIM, M. et al. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. **Journal of Food Engineering**, 2016.
- ARBTER, P. et al. Redox governed electro-fermentation improves lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 294, 1 dez. 2019.
- ARIF, Y. et al. **Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance** *Plant Physiology and Biochemistry* Elsevier Masson SAS, , 1 nov. 2020.
- ARUMUGAM, M. **Editorial: Advanced Technologies and Perspectives on Sustainable Microalgae Production** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* Frontiers Media S.A., , 17 fev. 2022.
- AUESUKAREE, C. **Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation** *Journal of Bioscience and Bioengineering* Elsevier B.V., , 1 ago. 2017.

- AVRAMIA, I.; AMARIEI, S. A Simple and Efficient Mechanical Cell Disruption Method Using Glass Beads to Extract β -Glucans from Spent Brewer's Yeast. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 2, 1 jan. 2022.
- BAI, M. et al. Culturable Diversity of Thraustochytrids from Coastal Waters of Qingdao and Their Fatty Acids. **Marine Drugs**, v. 20, n. 4, 1 abr. 2022.
- BALA, S. et al. **Recent Strategies for Bioremediation of Emerging Pollutants: A Review for a Green and Sustainable Environment** *Toxics* MDPI, , 1 ago. 2022.
- BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. **Production of food grade yeasts** *Food Technology and Biotechnology*, 2006.
- BINDEA, M. et al. **Valorification of crude glycerol for pure fractions of docosahexaenoic acid and β -carotene production by using *Schizochytrium limacinum* and *Blakeslea trispora*** *Microbial Cell Factories* BioMed Central Ltd., , 16 jun. 2018.
- BOURAS, S. et al. Effect of pH on *Schizochytrium limacinum* Production Grown Using Crude Glycerol and Biogas Digestate Effluent. **Agronomy**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2022.
- BUDRIESI, R. et al. **Chemical Features and Biological Effects of Astaxanthin Extracted from *Haematococcus pluvialis* Flotow: Focus on Gastrointestinal System.** MDPI AG, 7 jul. 2022
- CANONICO, L. et al. Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-*Saccharomyces* yeasts under different aeration conditions. **Food Microbiology**, v. 84, 1 dez. 2019.
- CARBONE, D. A.; MELKONIAN, M. **Potential of Porous Substrate Bioreactors for Removal of Pollutants from Wastewater Using Microalgae** *Bioengineering* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 out. 2023.
- CHEN, X. et al. **Cellular degradation systems in ferroptosis** *Cell Death and Differentiation* Springer Nature, , 1 abr. 2021.
- CHONGKHONG, S. Integration of Ensiled Corncob to Diluted Molasses as Carbon and Microbial Sources for Ethanol Production. **Trends in Sciences**, v. 21, n. 1, 1 jan. 2024.
- CHUNG, D. K.; PHUONG LE, N. Linear or Circular Economy: A Review of Theories, Practices, and Policy Recommendations for Vietnam. **Vietnam Journal of Agricultural Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1832–1845, 29 set. 2023.
- CICHONSKI, J.; CHRZANOWSKI, G. **Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids** *Molecules* MDPI, , 1 dez. 2022.
- CIOBANU, L. T. et al. Valorization of Spent Brewer's Yeast Bioactive Components via an Optimized Ultrasonication Process. **Fermentation**, v. 9, n. 11, 1 nov. 2023.
- COMUZZO, P. et al. Potential of high pressure homogenization to induce autolysis of wine yeasts. **Food Chemistry**, v. 185, p. 340–348, 2015.
- COMUZZO, P. et al. Application of multi-pass high pressure homogenization under variable temperature regimes to induce autolysis of wine yeasts. **Food Chemistry**, v. 224, p. 105–113, 2017.

COSTA, J. A. V. et al. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

COUVILLION, S. P. et al. **New mass spectrometry technologies contributing towards comprehensive and high throughput omics analyses of single cells** *Analyst* Royal Society of Chemistry, , 7 fev. 2019.

DAHIYA, D. et al. **Application of biological systems and processes employing microbes and algae to Reduce, Recycle, Reuse (3Rs) for the sustainability of circular bioeconomy** *AIMS Microbiology* AIMS Press, , 2022.

DAS, S. et al. Role of biotechnology in creating sustainable agriculture. **PLOS Sustainability and Transformation**, v. 2, n. 7, p. e0000069, 13 jul. 2023.

DE ANDRADE, A. F. et al. Microalgal production under mixotrophic conditions using cheese whey as substrate. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 27, n. 5, 2022.

DE ISEPPI, A. et al. Characterization and emulsifying properties of extracts obtained by physical and enzymatic methods from an oenological yeast strain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

DE SOUZA THEODORO, S. et al. Effects of the solubility of yeast cell wall preparations on their potential prebiotic properties in dogs. **PLoS ONE**, 2019.

DECARPIGNY, C. et al. **Bioprocesses for the Biodiesel Production from Waste Oils and Valorization of Glycerol** *Energies* MDPI, , 1 maio 2022.

DEVI, A. U. **Significance Of Biotechnology in Promoting Energy and Food Industries: Exploring the Potential of Bio-Based Products**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ijfmr.com>.

DIMOPOULOS, G. et al. Effect of pulsed electric fields on the production of yeast extract by autolysis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 48, p. 287–295, 2018.

DIMOPOULOS, G.; TSANTES, M.; TAOUKIS, P. Effect of high pressure homogenization on the production of yeast extract via autolysis and beta-glucan recovery. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 62, 2020.

DOMENECH, T.; BORRION, A. Embedding Circular Economy Principles into Urban Regeneration and Waste Management: Framework and Metrics. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 3, 1 fev. 2022.

DONNER, M.; GOHIER, R.; DE VRIES, H. A new circular business model typology for creating value from agro-waste. **Science of the Total Environment**, v. 716, 10 maio 2020.

ELHALIS, H. et al. The role of wet fermentation in enhancing coffee flavor, aroma and sensory quality. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 2, p. 485–498, 1 fev. 2021.

ELYAMNY, S. et al. Role of Combined Na₂ HPO₄ and ZnCl₂ in the Unprecedented Catalysis of the Sequential Pretreatment of Sustainable Agricultural and Agro-Industrial Wastes in Boosting Bioethanol Production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, 1 fev. 2022.

ENE, I. V. et al. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. **mBio**, v. 6, n. 4, 28 jul. 2015.

- ETHIER, S. et al. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 88–93, jan. 2011.
- FANKA, L. S. et al. Outdoor Production of Biomass and Biomolecules by *Spirulina* (*Arthrospira*) and *Synechococcus* cultivated with Reduced Nutrient Supply. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 1, p. 121–130, 1 mar. 2022.
- FENG, Y. et al. Construction of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Overexpression Strain of *Schizochytrium* sp. H016 to Improve Docosahexaenoic Acid Production. **Marine Drugs**, v. 21, n. 1, 1 jan. 2023.
- FLEURIL, F.; SATO, H. H. Produção de protoplastos e lise da parede celular de leveduras utilizando β -1,3 glucanase. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, p. 471–476, 2010.
- FRANCESCHI, D. et al. Umami in Wine: Impact of Glutamate Concentration and Contact with Lees on the Sensory Profile of Italian White Wines. **Beverages**, v. 9, n. 2, 1 jun. 2023.
- FRIGON, M. D.; LIU, D. Effect of high salinity on yeast activated sludge reactor operation. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 9, p. 2124–2134, 1 nov. 2016.
- FUNDO, J. F. et al. Induced Autolysis of Engineered Yeast Residue as a Means to Simplify Downstream Processing for Valorization—A Case Study. **Fermentation**, v. 9, n. 7, 1 jul. 2023.
- GANEVA, V. et al. Extraction of Proteins and Other Intracellular Bioactive Compounds From Baker's Yeasts by Pulsed Electric Field Treatment. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 15 dez. 2020.
- GARGALO, C. L. et al. Optimal Conversion of Organic Wastes to Value-Added Products: Toward a Sustainable Integrated Biorefinery in Denmark. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 4, 2022.
- GNOINSKI, G. B. et al. Towards accelerated autolysis? Dynamics of phenolics, proteins, amino acids and lipids in response to novel treatments and during ageing of sparkling wine. **Beverages**, v. 7, n. 3, 2021.
- GOMAR-ALBA, M.; MORCILLO-PARRA, M. Á.; DEL OLMO, M. LÍ. Response of yeast cells to high glucose involves molecular and physiological differences when compared to other osmotic stress conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 5, 1 ago. 2015.
- GOMES, T. A.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. **An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery** *Preparative Biochemistry and Biotechnology* Taylor and Francis Inc., , 3 ago. 2020.
- GOMEZ-CASATI, D. F.; BARCHIESI, J.; BUSI, M. V. Mitochondria and chloroplasts function in microalgae energy production. **PeerJ**, v. 10, 16 dez. 2022.
- GOYZUETA, M., L. D. et al. Production, characterization, and biological activity of a chitin-like EPS produced by *Mortierella alpina* under submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 247, 1 nov. 2020.
- GUERRINI, L. et al. A Technological Solution to Modulate the Aroma Profile during Beer Fermentation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 6, p. 1259–1266, 1 jun. 2018.

- HEINISCH, J. J. **How to study intertwined and autoregulated eukaryotic signal transduction pathways** *FEBS Journal* Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2020.
- HU, K. et al. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. **Food Chemistry**, v. 239, p. 495–501, 15 jan. 2018.
- JACOB, F. F.; HUTZLER, M.; METHNER, F.-J. Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 1, p. 95–109, 2019.
- JACOBS, C. et al. Challenges to the Circular Economy: Recovering Wastes from Simple versus Complex Products. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 5, 1 mar. 2022.
- JENDOUBI, T. **Approaches to integrating metabolomics and multi-omics data: A primer** *Metabolites* MDPI AG, , 1 mar. 2021.
- JENSEN, G. S.; PATTERSON, K. M.; YOON, I. Yeast culture has anti-inflammatory effects and specifically activates NK cells. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 2008.
- JIA, J. et al. Salicylic acid treatment and overexpression of a novel polyamine transporter gene for astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.
- JU, H. et al. Overexpression of *ZmDHN11* could enhance transgenic yeast and tobacco tolerance to osmotic stress. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 9, p. 1723–1733, 1 set. 2021.
- KALIYAMOORTHY, K. et al. PUFA and carotenoid producing thraustochytrids and their anti-microbial and antioxidant activities. **Frontiers in Marine Science**, v. 10, 2023.
- KARAMAN, K. Fabrication of gallic acid loaded yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) microcapsules: Effect of plasmolysis treatment and solvent type on bioactivity and release kinetics. **LWT**, v. 148, 1 ago. 2021.
- KARAYANNIS, D. et al. Yeast Lipid Produced through Glycerol Conversions and Its Use for Enzymatic Synthesis of Amino Acid-Based Biosurfactants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, 1 jan. 2023.
- KARCZEWSKI, K. J.; SNYDER, M. P. **Integrative omics for health and disease** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 1 maio 2018.
- KARITANI, Y. et al. Improvement of cell growth in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* through co-cultivation with yeast *Saccharomyces cerevisiae*. [s.d.].
- KIELKOPF, C. L.; BAUER, W.; URBATSCH, I. L. Bradford assay for determining protein concentration. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2020, n. 4, p. 136–138, 1 abr. 2020.
- KOT, A. M. et al. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, 1 out. 2019.
- KOT, A. M. et al. Comparison of simple and rapid cell wall disruption methods for improving lipid extraction from yeast cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 176, 1 set. 2020.

- LAI, J. X. et al. Enhancement of astaxanthin production from food waste by *Phaffia rhodozyma* screened by flow cytometry and feed application potential. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 70, n. 6, p. 1817–1829, 1 dez. 2023.
- LAO, Y. et al. A novel combination of enzymatic hydrolysis and fermentation: Effects on the flavor and nutritional quality of fermented *Cordyceps militaris* beverage. **LWT**, v. 120, 1 fev. 2020.
- LESK, A. M.; KONAGURTHU, A. S. Paths Through the Yeast Regulatory Network in Different Physiological States. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 21, 15 out. 2021.
- LI, J. et al. Improved cellulase production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by disrupting the cell wall protein-encoding gene *CWP2*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 2, p. 165–171, 1 fev. 2020a.
- LI, J. et al. Enhancing the accumulation of lipid and docosahexaenoic acid in *Schizochytrium* sp. by co-overexpression of phosphopantetheinyl transferase and ω -3 fatty acid desaturase. **Biotechnology Journal**, v. 18, n. 12, 1 dez. 2023.
- LI, J.; WANG, J.; LI, Q. Overexpression of *FKS1* to improve yeast autolysis-stress. **Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 1344–1354, 2015.
- LI, X. et al. Transcriptomic analysis reveals MAPK signaling pathways affect the autolysis in baker's yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 5, 1 ago. 2020b.
- LI, X. et al. Transcriptomic analysis reveals MAPK signaling pathways affect the autolysis in baker's yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 5, 1 ago. 2020c.
- LIANG, Y. et al. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6745–6750, 2010.
- LINTON, S. M. **Review: The structure and function of cellulase (endo- β -1,4-glucanase) and hemicellulase (β -1,3-glucanase and endo- β -1,4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter** *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology* Elsevier Inc., , 1 fev. 2020.
- LIU, N. et al. Effect of yeast cell wall on the growth performance and gut health of broilers challenged with aflatoxin B 1 and necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 97, n. 2, p. 477–484, 1 fev. 2018.
- LIU, Y. et al. **Advancing single-cell proteomics and metabolomics with microfluidic technologies** *Analyst* Royal Society of Chemistry, , 7 fev. 2019.
- LIU, Y.; WEI, D.; CHEN, W. Oleaginous Microalga *Coccomyxa subellipsoidea* as a Highly Effective Cell Factory for CO₂ Fixation and High-Protein Biomass Production by Optimal Supply of Inorganic Carbon and Nitrogen. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 6 jun. 2022.
- LIU, Z. L.; WANG, X.; WEBER, S. A. Tolerant industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* posses a more robust cell wall integrity signaling pathway against 2-furaldehyde and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde. **Journal of Biotechnology**, v. 276–277, p. 15–24, 20 jun. 2018.

- LO, S.-C. et al. Growth and Autolysis of *Kluyveromyces Marxianus* Stimulated with Lactate Provides Insights into Symbiosis. 2021.
- LOBUS, N. V. et al. Production of Fluorescent Dissolved Organic Matter by Microalgae Strains from the Ob and Yenisei Gulfs (Siberia). **Plants**, v. 11, n. 23, 1 dez. 2022.
- LUNA-FLORES, C. H. et al. An enhanced electron transport chain improved astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 1382–1398, 1 maio 2023.
- LUTSENKO, A. V.; SOPRUNOVA, O. B. Yest autolysates as components of nutrient media for cultivation of microorganisms. **Вестник Пермского университета. Серия «Биология»=Bulletin of Perm University. Biology**, n. 3, p. 226–234, 2022.
- MAKINO, S. et al. Selectivity of mRNA degradation by autophagy in yeast. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.
- MARTINEZ-BURGOS, W. J. et al. Hydrogen production by dark fermentation using a new low-cost culture medium composed of corn steep liquor and cassava processing water: Process optimization and scale-up. **Bioresource Technology**, v. 320, 1 jan. 2021.
- MITCHELL, A.; WEI, P.; LIM, W. A. **Oscillatory stress stimulation uncovers an Achilles' heel of the yeast MAPK signaling network**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.
- MONTOYA-VALLEJO, C.; GUZMÁN DUQUE, F. L.; QUINTERO DÍAZ, J. C. Biomass and lipid production by the native green microalgae *Chlorella sorokiniana* in response to nutrients, light intensity, and carbon dioxide: experimental and modeling approach. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.
- MUSSAGY, C. U. et al. Is the carotenoid production from *Phaffia rhodozyma* yeast genuinely sustainable? a comprehensive analysis of biocompatibility, environmental assessment, and techno-economic constraints. **Bioresource Technology**, p. 130456, abr. 2024.
- NAKATOGAWA, H.; OHSUMI, Y. **Autophagic degradation of the endoplasmic reticulum** *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* Japan Academy, , 2020.
- NASEEMA RASHEED, R. et al. **Microalgal co-cultivation -recent methods, trends in omic-studies, applications, and future challenges** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* Frontiers Media SA, , 2023.
- NASTARI, R.; PISANO, S.; POZZOLI, M. **Circular economy disclosure by agri-food companies**. Virtus Interpress, 2022
- NCUBE, A. et al. Circular Economy and Green Chemistry: The Need for Radical Innovative Approaches in the Design for New Products. **Energies**, v. 16, n. 4, 1 fev. 2023.
- NGUYEN, T. D. et al. Highlighting Protective Effect of Encapsulation on Yeast Cell Response to Dehydration Using Synchrotron Infrared Microspectroscopy at the Single-Cell Level. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- NIERI, P. et al. **Bioactive Molecules from Marine Diatoms and Their Value for the Nutraceutical Industry** *Nutrients* MDPI, , 1 jan. 2023.
- NIK, M. et al. **Autolysis of spent baker's yeast generated from sago bioethanol fermentation: a preliminary study** *Research Journal of Biotechnology*. [s.l: s.n.].

- NIKOO, M. et al. Autolysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing by-products: Enzymatic activities, lipid and protein oxidation, and antioxidant activity of hydrolysates. **Food Bioscience**, v. 39, 1 fev. 2021.
- NÚÑEZ, Y. P. et al. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006.
- OLIVEIRA, A. S. et al. Spent Yeast Valorization for Food Applications: Effect of Different Extraction Methodologies. **Foods**, v. 11, n. 24, 1 dez. 2022.
- OLIVER, L. et al. Production of Docosahexaenoic Acid and Odd-Chain Fatty Acids by Microalgae *Schizochytrium limacinum* Grown on Waste-Derived Volatile Fatty Acids. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 8, 1 abr. 2022.
- ORUGANTI, R. K. et al. **Spirulina Cultivation Using Biogas CO₂ as the Carbon Source: Preliminary Study on Biomass Growth and Productivity**. E3S Web of Conferences. **Anais...EDP Sciences**, 14 set. 2023
- PANTALEO MISSANA, W.; MASHINGO, P. P.; TUMBO, S. The Biogas Production from Brewery Waste: A Case Study for Tanzania Breweries Company Limited (Arusha-Branch). **Journal of Energy Research and Reviews**, p. 26–37, 8 jan. 2022.
- PARK, Y. C. et al. A rice really interesting new gene H2-type E3 ligase, OsSIRH2-14, enhances salinity tolerance via ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of salt-related proteins. **Plant Cell and Environment**, v. 42, n. 11, p. 3061–3076, 1 nov. 2019.
- PARMAR, P. et al. **Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions** *Frontiers in Plant Science* Frontiers Media S.A., , 2023.
- PATEL, A. et al. A novel rapid ultrasonication-microwave treatment for total lipid extraction from wet oleaginous yeast biomass for sustainable biodiesel production. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 51, p. 504–516, 1 mar. 2019.
- PÉREZ-TORRADO, R. et al. **Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry** *Trends in Food Science and Technology*, 2015.
- PERMYAKOVA, L. et al. Combined Effect of Ultrasound Treatment and a Mix of Krebs Cycle Acids on the Metabolic Processes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Fermentation**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2023.
- QUESADA-SALAS, M. C. et al. Article optimization and comparison of three cell disruption processes on lipid extraction from microalgae. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 1–20, 1 fev. 2021.
- RAI, K. K. et al. Cyanobacterial Diversity Assessment Under Diverse Environments: A Molecular Approach. **Indian Journal of Plant Genetic Resources**, v. 35, n. 3, p. 346–350, 2022.
- RAKOWSKA, R. et al. **Spent yeast as natural source of functional food additives** *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 2017.
- RAWLING, M. et al. Yeast cell wall extracts from *Saccharomyces cerevisiae* varying in structure and composition differentially shape the innate immunity and mucosal tissue responses of the intestine of zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Immunology**, 2023.

- REDDY, V. V. et al. **Waste to Wealth Generation: Innovative Methodologies in Resource Utilization and Minimization in Circular Economy**. E3S Web of Conferences. *Anais...EDP Sciences*, 30 nov. 2023
- REN, L. J. et al. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1649–1656, ago. 2010.
- RIBEIRO, R. A.; BOURBON-MELO, N.; SÁ-CORREIA, I. **The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts***Frontiers in Microbiology*Frontiers Media S.A., , 28 jul. 2022.
- RIGHINI, H. et al. **Cyanobacteria: A Natural Source for Controlling Agricultural Plant Diseases Caused by Fungi and Oomycetes and Improving Plant Growth***Horticulturae*MDPI, , 1 jan. 2022.
- RIVERA FLORES, V. K. et al. Leveraging Milk Permeate Fermentation to Produce Lactose-Free, Low-In-Glucose, Galactose-Rich Bioproducts: Optimizations and Applications. **Fermentation**, v. 9, n. 9, 1 set. 2023.
- ROBBINS, C. J. et al. Nutrient and stoichiometry dynamics of decomposing litter in stream ecosystems: A global synthesis. **Ecology**, v. 104, n. 7, 1 jul. 2023.
- RODIAS, E. et al. **Water-energy-nutrients synergies in the agrifood sector: A circular economy framework***Energies*MDPI AG, , 1 jan. 2021.
- ROMANO, P. et al. **Role of Yeasts on the Sensory Component of Wines***Foods*MDPI, , 1 jul. 2022.
- SAINI, P. et al. **Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation***Process Biochemistry*Elsevier Ltd, , 1 set. 2018.
- SALINAS-VELANDIA, D. A. et al. Insights into Circular Horticulture: Knowledge Diffusion, Resource Circulation, One Health Approach, and Greenhouse Technologies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, 1 out. 2022.
- SANTANA, Á. L.; MEIRELES, M. A. A. **Valorization of Cereal Byproducts with Supercritical Technology: The Case of Corn***Processes*MDPI, , 1 jan. 2023.
- SHELDON, R. A.; BRADY, D. **Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future***ChemSusChem*John Wiley and Sons Inc, , 6 maio 2022.
- SHEN, D. et al. **A review of yeast: High cell-density culture, molecular mechanisms of stress response and tolerance during fermentation***FEMS Yeast Research*Oxford University Press, , 2022.
- SHURSON, G. C. **Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods***Animal Feed Science and Technology*, 2018.
- SIDDIKI, S. Y. A. et al. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, 1 jan. 2022.
- SINGH, D. et al. Extraction, separation and purification of fatty acid ethyl esters for biodiesel and DHA from *Thraustochytrid* biomass. **Biotechnology Journal**, v. 19, n. 1, 1 jan. 2024.

SIVAKUMAR, R. et al. **Sustainable production of eicosapentaenoic acid-rich oil from microalgae: Towards an algal biorefinery** *Journal of Applied Microbiology* John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2022.

SONG, Y. et al. **Thraustochytrids as a promising source of fatty acids, carotenoids, and sterols: bioactive compound biosynthesis, and modern biotechnology** *Critical Reviews in Biotechnology* Taylor and Francis Ltd., , 2023.

SONI, M. et al. Factors Affecting the Production of Astaxanthin in the Microalgae *Haematococcus pluvialis*: A Review. **International Journal of Current Research and Review**, v. 14, n. 11, p. 37–46, 2022.

SRIPUTORN, B. et al. Enhancement of ethanol production efficiency in repeated-batch fermentation from sweet sorghum stem juice: Effect of initial sugar, nitrogen and aeration. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 46, p. 55–64, 1 jul. 2020.

SU, X. et al. Optimization of yeast autolysis under solid-state fermentation conditions. **Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 726–736, 2019.

TAKAGI, H. **Molecular mechanisms and highly functional development for stress tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Oxford University Press, , 1 maio 2021.

TAKALLOO, Z. et al. Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): a comparative study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, 2020.

TAKALLOO, Z. et al. Acceleration of Yeast Autolysis by Addition of Fatty Acids, Ethanol and Alkaline Protease. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 54–65, 1 jul. 2022.

TALBIERZ, S. et al. Optimization of Lipid Production by *Schizochytrium limacinum* Biomass Modified with Ethyl Methane Sulfonate and Grown on Waste Glycerol. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 5, 1 mar. 2022a.

TALBIERZ, S. et al. Optimization of Lipid Production by *Schizochytrium limacinum* Biomass Modified with Ethyl Methane Sulfonate and Grown on Waste Glycerol. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 5, 1 mar. 2022b.

TIMOTHEO, C. A. et al. Evaluation of cell disruption methods in the oleaginous yeasts *Yarrowia lipolytica* QU21 and *Meyerozyma guilliermondii* BI281A for microbial oil extraction. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 95, n. 4, 2023.

TRONCHONI, J. et al. Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale. **Food Microbiology**, v. 70, p. 214–223, 1 abr. 2018.

UDOM, N. et al. Coordination of the cell wall integrity and highosmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 15, 2019.

USMANI, Z. et al. **Bioprocessing of waste biomass for sustainable product development and minimizing environmental impact** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2021.

- VALLADARES-DIESTRA, K. K. et al. **The Potential of Xylooligosaccharides as Prebiotics and Their Sustainable Production from Agro-Industrial by-Products** *Foods* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jul. 2023.
- VAN DEN ABBEELE, P. et al. Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 6, p. 1–10, 2020.
- VELOSO, I. I. K. et al. Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 60–70, 15 jan. 2019.
- VIEIRA, E. F.; MELO, A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Autolysis of intracellular content of Brewer's spent yeast to maximize ACE-inhibitory and antioxidant activities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 255–259, 2017.
- VINUTHNA, M.; RAJU, K. J. Studies on the Production of Protease by *Aspergillus Oryzae* Ncim 637 under Solid-state Fermentation using Mixed Substrates of Prawn's Shell and Fish Meal Powder. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, p. 7–14, 19 abr. 2022.
- VOORDECKERS, K. et al. Ethanol exposure increases mutation rate through error-prone polymerases. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.
- WANG, C. et al. Coffee flavour modification through controlled fermentation of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*: Part II. Mixed cultures with or without lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 136, 1 out. 2020.
- WANG, J. et al. Cell wall polysaccharides: before and after autolysis of brewer's yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 9, 2018.
- WANG, J. et al. Regulations of RLM1 gene affect the anti-autolytic ability of lager yeast. **Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 1059–1070, 2019.
- WATANABE, D. Sake yeast symbiosis with lactic acid bacteria and alcoholic fermentation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 21 fev. 2023.
- XIANG, Z. **Progress of Algalculture technology as Biofuel** *Highlights in Science, Engineering and Technology EMCEME*. [s.l: s.n.].
- YAN, G. et al. Effects of initial oxygenation on chemical and aromatic composition of wine in mixed starters of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 90, 1 set. 2020.
- YANG, L. et al. Transcriptomics analysis and fed-batch regulation of high astaxanthin-producing *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous* obtained through adaptive laboratory evolution. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, 2023.
- YIM, W. W. Y.; MIZUSHIMA, N. **Lysosome biology in autophagy** *Cell Discovery* Springer Nature, , 1 dez. 2020.
- ZAINUDDIN, M. F. et al. **Current pretreatment/cell disruption and extraction methods used to improve intracellular lipid recovery from oleaginous yeasts** *Microorganisms* MDPI AG, , 1 fev. 2021.

ZAREI, Z. et al. Investigation of Hydrodynamic Parameters in an Airlift Photobioreactor on CO₂ Biofixation by *Spirulina* sp. **Sustainability (Switzerland)**, v. 14, n. 12, 1 jun. 2022.

ZHANG, P. et al. **Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review** **Food Microbiology** Academic Press, , 1 dez. 2021.

ZHANG, Z. H. et al. The Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) Chlorophylls Microencapsulated in Different Ratios of Gum Arabic and Whey Protein Isolate. **Foods**, v. 11, n. 12, 1 jun. 2022.

ZHENG, Z. et al. Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast B-glucan. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 394–403, 1 fev. 2019.