

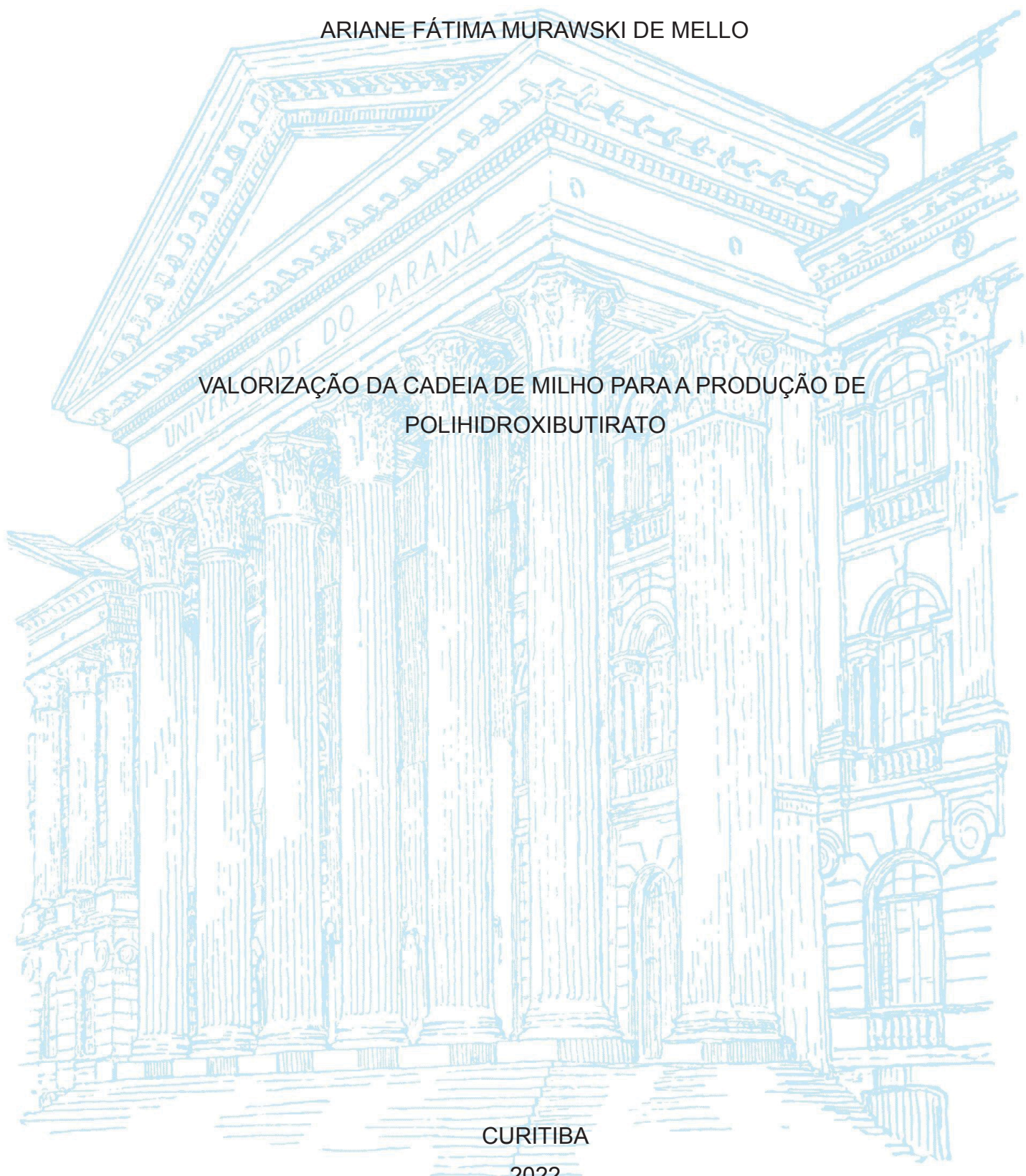
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ARIANE FÁTIMA MURAWSKI DE MELLO

VALORIZAÇÃO DA CADEIA DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIBUTIRATO

CURITIBA

2022



ARIANE FÁTIMA MURAWSKI DE MELLO

VALORIZAÇÃO DA CADEIA DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIBUTIRATO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2022

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

Mello, Ariane Fátima Murawski de
Valorização da cadeia de milho para a produção de polihidroxibutirato /
Ariane Fátima Murawski de Mello. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Luciana Porto de Souza Vandenberghe
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

1. Hidrólise. 2. Milho. 3. Glicerol. 4. BiorrefinariaI. I. Vandenberghe,
Luciana Porto de Souza. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Universidade
Federal do Paraná. Programa de pós-Graduação em Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

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 dissertação de Mestrado de **ARIANE FÁTIMA MURAWSKI DE MELLO** intitulada: **Valorização da Cadeia do Milho para a Produção de Polihidroxibutirato**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, 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 mestra 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, 20 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 11:29:16.0

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/10/2022 15:11:59.0

CARLOS RICARDO SOCCOL

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 11:42:46.0

KIM KLEY VALLADARES DIESTRA

Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 13:34:49.0

JULIO CESAR DE CARVALHO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/10/2022 20:17:28.0

PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (OUTROS)

Dedico este trabalho a minha mãe, Angela.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as mulheres que me auxiliaram de alguma maneira no decorrer dessa jornada.

À Professora Luciana Porto de Souza Vandenberghe pela sua orientação e confiança no meu trabalho, me permitindo ter a independência de desenvolver aquilo que gostaria e sendo um suporte constante.

À minha mãe Angela Maria Murawski por todo amor e cuidado durante todos esses anos e por ser o meu maior exemplo.

Às estagiárias Clara e Manuela, por todo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pelo apoio prestado.

Às minhas colegas de laboratório Priscilla e Zulma, por todos os conselhos sobre trabalho e pela amizade e suporte.

Gostaria também de agradecer ao Professor Júlio César de Carvalho e à Professora Cristine Rodrigues pelo auxílio nas técnicas analíticas, colaboração e conselhos.

Ao Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, com destaque para a pessoa do Professor Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade concedida.

Aos colegas do Programa pelas conversas e contribuições, em especial a Rafaela, Leonardo, Alex, Bruna, Walter, Gustavo e Kim.

Aos meus amigos Karine, Camille, Gabriel, Willian, André, Stephanie, Janaina, Rhaiza e Lana por toda a amizade, suporte e por serem fortaleza em momentos difíceis.

Ao Departamento de Química pelo apoio nas análises de quantificação realizadas para o trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de estudos.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

O milho é um produto agrícola cultivado mundialmente em ampla escala, podendo ser aplicado para a produção de alimentos, ração animal e a obtenção de outras biomoléculas de interesse, como é o caso do bioetanol de primeira geração. A integração da produção de biocombustíveis e outros bioprodutos cria sistemas de biorrefinaria, agregando valor ao substrato de origem. Os bioplásticos são produtos visados em tais sistemas, sendo definidos como polímeros de origem biológica que apresentam biodegradabilidade. O polihidroxibutirato (PHB) é um biopoliéster que serve de reserva energética para organismos quando submetidos a condições de estresse metabólico, e processos fermentativos podem ser aplicados para sua produção em larga escala. O presente trabalho avaliou a produção de PHB a partir da combinação de hidrolisado da fração amilácea do milho moído e glicerol residual como substratos, criando-se assim uma oportunidade para a implantação de um sistema de biorrefinaria de bioplásticos e combustíveis derivados do milho. Foram comparados e otimizados métodos de hidrólise do milho moído. Para a hidrólise ácida, o rendimento máximo obtido foi de 66% representando 77 g/L de açúcares redutores (12,5% m/v substrato inicial, volume reacional de 50 mL, HCl 1% v/v, 121°C, 1 atm, 15 minutos). Já na hidrólise enzimática, um rendimento de 75% foi obtido com 110 g/L de açúcares (15% m/v substrato inicial, volume reacional de 1 litro, 0,25 mg α -amilase/g substrato, 0,35 mg glucoamilase/g substrato, 4 horas de reação total). O hidrolisado enzimático foi aplicado em conjunto com glicerol residual como fonte de carbono para a produção de PHB por *Cupriavidus necator* LPB 1421, ureia e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Após etapas de otimização da composição do meio de produção, um acúmulo máximo de 62% de PHB em 72 horas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de volume operacional foi obtido, representando 11,64 g/L e produtividade de 0,162 g/L.h. Em sistema de biorreator de bancada com 8 litros de volume operacional, 70% de acúmulo de PHB foi reportado em 72 horas de processo – valor considerado alto para uma cepa não recombinante –, o que representa 14,17 g/L do biopolímero com produtividade de 0,197 g/L.h. O PHB recuperado, utilizando-se de um método de digestão química com hipoclorito de sódio, apresentou > 99% de pureza. Assim, demonstrou-se o potencial da aplicação de milho moído e glicerol residual para a obtenção de PHB e a oportunidade de integração de processos com produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: polihidroxibutirato; milho moído; glicerol residual, hidrólise enzimática; biorrefinaria.

ABSTRACT

Maize is an agro-industrial product cultivated globally in a large scale, which can be applied to food production, animal feeding and to the obtainment of several biomolecules, such as first-generation bioethanol. The integration of production of biofuels and other bioproducts creates biorefinery systems, aggregating value to the substrate. Bioplastics are envisioned products in these systems, being defined as polymers that possess a biological origin and present biodegradability. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biopolymer that serves as an energetic reservoir for microorganisms when submitted to conditions of metabolic stress and fermentative processes can be applied to their production in large scale. This work evaluated the production of PHB from the combination of milled corn starchy fraction hydrolysate and residual glycerol as substrates, generating the opportunity of a biorefinery system of bioplastics and fuels derived from corn. Different methods of hydrolysis were compared and optimized. In the acid hydrolysis, the maximum yield obtained was 66%, which represents 77 g/L of reducing sugars (12.5% w/v initial substrate, 50 mL reactional volume, HCl 1% v/v, 121°C, 1 atm, 15 minutes). For the enzymatic hydrolysis, the yield was 75% yield, representing 110 g/L of reducing sugars (15% w/v initial substrate, 1 liter reaction volume, 0.25 mg α -amylase/g substrate, 0.35 mg glucoamylase/g substrate, 4 hours of complete reaction). The enzymatic hydrolysate was applied together with residual glycerol as carbon source for the production of PHB by the strain *Cupriavidus necator* LPB 1421, being urea and yeast extract the nitrogen sources. After optimization steps, a maximum accumulation of 62% of PHB in a 72 hours process in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of operational volume was obtained, which represents 11.64 g/L and productivity of 0.162 g/L.h. In a bench bioreactor system with 8 liters of operational volume, 70% of PHB accumulation was reported – considered a high value for a non-recombinant strain –, representing 14.17 g/L of the biopolymer with 0.197 g/L.h of productivity. The recovered PHB, by a chemical digestion method using sodium hypochlorite, presented purity of > 99%. Therefore, it was demonstrated the potential of the application of milled corn as substrate for PHB production and the opportunity of process integration with biofuels production.

Keywords: polyhydroxybutyrate; milled corn; residual glycerol; enzymatic hydrolysis; biorefinery.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – PROPOSTA DE INTEGRAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHB COM BIOCOMBUSTÍVEIS.....	21
FIGURA 2.1 – PROCESSAMENTO DO MILHO.....	27
FIGURA 2.2 – (a) ESTRUTURA DO AMIDO COM SEUS POLISSACARÍDEOS AMILOSE E AMILOPECTINA (b) HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO (c) HIDRÓLISE COM CATALISADOR ÁCIDA DO AMIDO...	28
FIGURA 2.3 – ROTAS METABÓLICAS DE ASSIMILAÇÃO DO GLICEROL.....	31
FIGURA 2.4 – ESTRUTURA GERAL DE PHAS E EXEMPLOS DE scl-PHAs e mcl-PHAs.....	36
FIGURA 2.5 – ROTAS METABÓLICAS DA PRODUÇÃO DE PHAs.....	39
FIGURA 2.6 – ANÁLISE DOS DADOS DE DOCUMENTOS DE PATENTE OBTIDOS NA BUSCA REALIZADA NA BASE DII ACERCA DE (a) ANO DE PUBLICAÇÃO (b) PAÍS DE ORIGEM (c) CLASSIFICAÇÃO e (d) TIPO DO DETENTOR.....	49
FIGURA 3.1 – ETAPAS SEGUIDAS PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO AMILÁCEA DO MILHO MOÍDO.....	57
FIGURA 3.2 – MILHO MOÍDO FORNECIDO PELA EMPRESA BTZ.....	64
FIGURA 3.3 – HIDROLISADOS OBTIDOS APÓS PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO AMIDO DE MILHO MOÍDO (A) COMPARAÇÃO VISUAL DOS HIDROLISADOS OBTIDOS (B) SEPARAÇÃO DE FASES SÓLIDA E LÍQUIDA.....	66
FIGURA 3.4 – EFEITO DA AÇÃO ENZIMÁTICA NO MILHO MOÍDO COM (a) 10% DE SÓLIDOS INICIAIS (b) 15% DE SÓLIDOS INICIAIS e (c) 20 E 25% DE SÓLIDOS INICIAIS.....	68
FIGURA 3.5 – CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES PELA HIDRÓLISE COM GLUCOAMILASE (SACARIFICAÇÃO) À 33°C NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SÓLIDOS REMANESCENTES DA LIQUEFAÇÃO...	74
FIGURA 3.6 – BALANÇO DE MASSA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM TANQUE AGITADO COM 1 LITRO DE VOLUME REACIONAL.....	75
FIGURA 4.1 – ESTRATÉGIA D APLICADA PARA SSF.....	88

FIGURA 4.2 – CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> E PRODUÇÃO DE PHB EM DIFERENTES RELAÇÕES ENTRE CARBONO E NITROGÊNIO..	104
FIGURA 4.3 – DIAGRAMAS DE PARETO OBTIDOS PARA AS RESPOSTAS DE (a) ACÚMULO (%) DE PHB e (b) BIOMASSA RESIDUAL (g/L).....	108
FIGURA 4.4 – EFEITO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FOSFATO NO ACÚMULO DE PHB (a) DIAGRAMA DE PARETO (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE FONTE DE CARBONO VS. KH ₂ PO ₄	112
FIGURA 4.5 – EFEITO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FOSFATO NA CONCENTRAÇÃO DE PHB (a) DIAGRAMA DE PARETO (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE FONTE DE CARBONO VS. KH ₂ PO ₄	112
FIGURA 4.6 – EFEITO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FOSFATO NO PESO SECO (a) DIAGRAMA DE PARETO (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE FONTE DE CARBONO VS. KH ₂ PO ₄	113
FIGURA 4.7 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> , ACÚMULO E PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DA FONTE DE CARBONO UTILIZANDO MEIO MSM OTIMIZADO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER.....	118
FIGURA 4.8 – PRODUÇÃO DE PHB EM BIORREATOR DE BANCADA COM 8 LITROS DE VOLUME OPERACIONAL EM (a) 0h (b) 18h.....	120
FIGURA 4.9 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> , ACÚMULO E PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DA FONTE DE CARBONO UTILIZANDO MEIO MSM OTIMIZADO EM BIORREATOR DE BANCADA COM VOLUME OPERACIONAL DE 8 LITROS.....	121
FIGURA 4.10 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ENTRE FRASCOS DE ERLLENMEYER E BIORREATOR DE BANCADA COM VOLUME OPERACIONAL DE 8 LITROS EM CINÉTICA DE (a) CRESCIMENTO CELULAR; (b) ACÚMULO DE PHB e (c) PRODUÇÃO DE PHB.....	122
FIGURA 4.11 – COMPARAÇÃO VISUAL DOS DIFERENTES MODOS DE RECUPERAÇÃO DE PHB (a) COM CÉLULAS FRESCAS (b) COM	

CÉLULAS LIOFILIZADAS (c) COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS
MODOS (d) COMPARAÇÃO COM O PADRÃO..... 128

FIGURA 4.12 – COMPARAÇÃO VISUAL DOS DIFERENTES MODOS DE
RECUPERAÇÃO DE PHB APÓS A ELABORAÇÃO DOS BIOFILMES
(a) COM CÉLULAS FRESCAS (b) COM CÉLULAS LIOFILIZADAS (c)
COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MODOS..... 128

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – EMPRESAS PRODUTORAS DE PHAS AO REDOR DO MUNDO...	34
TABELA 2.2 – PROPRIEDADES DO PHB QUANDO COMPARADO À PLÁSTICOS CONVENCIONAIS.....	37
TABELA 2.3 – EXEMPLOS DE PRODUÇÃO DA PHAs A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS.....	42
TABELA 2.4 – EXEMPLOS A DOCUMENTOS DE PATENTE REFERENTES À PRODUÇÃO E/OU APLICAÇÃO DE PHAs.....	50
TABELA 3.1 – COMPOSIÇÃO DO MILHO.....	52
TABELA 3.2 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS NA LIQUEFAÇÃO E SACARIFICAÇÃO DO AMIDO DE MILHO.....	59
TABELA 3.3 – CARACTERIZAÇÃO DO MILHO MOÍDO.....	63
TABELA 3.4 – DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DO MILHO MOÍDO.....	64
TABELA 3.5 – AÇÚCARES OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA DO MILHO MOÍDO.....	65
TABELA 3.6 – HIDRÓLISE DO MILHO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE SÓLIDOS.....	67
TABELA 3.7 – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SÓLIDOS REMANESCENTES CONTENDO AMIDO RESIDUAL.....	69
TABELA 3.8 – HIDRÓLISE DE MILHO MOÍDO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	70
TABELA 3.9 – PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DO AMIDO DE MILHO NA ETAPA DE LIQUEFAÇÃO COM α -AMILASE.....	71
TABELA 3.10 – ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOAMILASE.....	72
TABELA 3.11 – HIDRÓLISE DO MILHO MOÍDO EM TANQUE AGITADO.....	75
TABELA 3.12 – COMPARAÇÃO DA ENERGIA NECESSÁRIA PARA CADA MÉTODO.....	76
TABELA 3.13 – PREÇO DOS REAGENTES USADOS PARA CADA PROCESSO DE HIDRÓLISE DE MILHO MOÍDO.....	77

TABELA 3.14 – RENDIMENTOS OBTIDOS DA HIDRÓLISE DO AMIDO DO MILHO COM DIFERENTES MÉTODOS.....	78
TABELA 4.1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT-BURMAN DE 12 ENSAIOS E 7 FATORES.....	85
TABELA 4.2 – VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NOS ENSAIOS DO PB.....	85
TABELA 4.3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR COM 16 ENSAIOS E 3 VARIÁVEIS.....	86
TABELA 4.4 – CRESCIMENTO DO INÓCULO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM 24 E 48 HORAS.....	95
TABELA 4.5 – CRESCIMENTO DO INÓCULO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MILHOCINA EM 24 E 48 HORAS.....	96
TABELA 4.6 – CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> EM MEIO MSM COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO TENDO (NH ₄) ₂ SO ₄ COMO FONTE DE NITROGÊNIO.....	98
TABELA 4.7 – CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> EM DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE HIDROLISADO E GLICEROL RESIDUAL.....	99
TABELA 4.8 – CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> EM MEIO MSM COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO TENDO HIDROLISADO DE FRAÇÃO AMILÁCEA DO MILHO MOÍDO E GLICEROL RESIDUAL (PROPORÇÃO 70:30) COMO FONTE DE CARBONO.....	100
TABELA 4.9 – CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> EM MEIO MSM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MILHOCINA PARA SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES.....	102
TABELA 4.10 – CRESCIMENTO DE <i>C. necator</i> E PRODUÇÃO DE PHB EM DIFERENTES RELAÇÕES ENTRE CARBONO E NITROGÊNIO..	104
TABELA 4.11 – RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PB PARA <i>SCREENING</i> DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS.....	106
TABELA 4.12 – ESTATÍSTICAS OBTIDAS PARA AS RESPOSTAS DE BIOMASSA RESIDUAL (g/L) E ACÚMULO DE PHB (%).....	108
TABELA 4.13 – RESULTADOS OBTIDOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2 ³	109
TABELA 4.14 – ESTATÍSTICAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2 ³	111

TABELA 4.15 – COEFICIENTES E p-valores OBTIDOS PARA OS DIFERENTES MODELOS GERADOS.....	114
TABELA 4.16 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DOS MODELOS GERADOS.....	116
TABELA 4.17 – RESULTADOS OBTIDOS NO MODO DE OPERAÇÃO DE SSF COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE INÓCULO E ALIMENTAÇÃO DE ENZIMA.....	124
TABELA 4.18 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM OPERAÇÃO DE BATELADA ALIMENTADA COM DIFERENTES TEMPOS DE ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO DE GLICOSE.....	126
TABELA 4.19 – RENDIMENTO E PUREZA OBTIDOS COM DIFERENTES MODOS DE RECUPERAÇÃO DO PHB.....	127

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Justificativa.....	21
1.2	Objetivos.....	22
1.2.1	Objetivo geral.....	22
1.2.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	Introdução.....	24
2.2	Biorrefinaria de milho.....	26
2.3	Glicerol.....	29
2.4	Polihidroxialcanoatos.....	32
2.4.1	Contexto histórico.....	32
2.4.2	Produção e mercado.....	33
2.4.3	Classificação de PHAs.....	34
2.4.4	Biossíntese de PHAs.....	37
2.4.5	Métodos de recuperação de PHAs.....	44
2.4.6	Aplicações industriais.....	45
2.5	Levantamento de dados sobre patentes e inovação.....	46
3	OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DA FRAÇÃO AMILÁCEA DO MILHO MOÍDO.....	51
3.1	Introdução.....	51
3.2	Material e Métodos.....	52
3.2.1	Recebimento e condicionamento do milho moído.....	52
3.2.2	Caracterização do material.....	53
3.2.3	Hidrólise ácida do milho moído.....	55
3.2.4	Hidrólise enzimática do amido do milho moído.....	56
3.2.5	Otimização da hidrólise enzimática do amido do milho moído.....	57
3.2.5.1	Avaliação de diferentes concentrações iniciais de sólidos e teste de pré-gelatinização do amido.....	57
3.2.5.2	Avaliação da hidrólise dos sólidos remanescentes.....	58
3.2.5.3	Avaliação da variação da concentração das enzimas amilolíticas em conjunto.....	58

3.2.5.4	Avaliação da variação de concentração de α -amilase.....	59
3.2.5.5	Avaliação da variação de concentração de glucoamilase.....	59
3.2.6	Avaliação da viabilidade de processo de sacarificação e fermentação simultânea.....	60
3.2.7	Hidrólise em tanque agitado de 1L	60
3.2.8	Comparação de custos da hidrólise ácida e enzimática do amido de milho moído.....	61
3.2.9	Procedimentos analíticos.....	62
3.2.10	Análises estatísticas.....	62
3.3	Resultados e discussão.....	62
3.3.1	Caracterização do material.....	62
3.3.2	Hidrólise ácida do milho moído.....	64
3.3.3	Hidrólise enzimática do milho moído.....	66
3.3.3.1	Avaliação de diferentes concentrações iniciais de sólidos e teste de pré-gelatinização do amido.....	66
3.3.3.2	Avaliação da hidrólise dos sólidos remanescentes após hidrólise com amilases.....	68
3.3.3.3	Avaliação do efeito da concentração de enzimas amilolíticas.....	69
3.3.3.4	Avaliação da variação da concentração de α -amilase.....	70
3.3.3.5	Avaliação da variação da concentração de glucoamilase.....	71
3.3.4	Avaliação da viabilidade de processo de sacarificação e fermentação simultânea.....	72
3.3.5	Hidrólise em tanque agitado de 1 L.....	74
3.3.5	Comparação de custos da hidrólise ácida e enzimática do amido de milho moído.....	75
3.4	Conclusões.....	77
4	PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE MILHO MOÍDO E GLICEROL RESIDUAL.....	79
4.1	Introdução.....	79
4.2	Material e Métodos.....	79
4.2.1	Microrganismos e reagentes.....	79
4.2.2	Obtenção do hidrolisado da fração amilácea do milho moído.....	80
4.2.3	Preparo do meio de cultivo do inóculo e de produção de PHAs.....	81

4.2.3.1	Meio do inóculo.....	81
4.2.3.2	Meio de produção.....	81
4.2.4	Comparação de diferentes fontes de carbono para o desenvolvimento do inóculo.....	81
4.2.5	Avaliação da adição da milhocina como substituto do extrato de levedura para inóculo.....	82
4.2.6	Estudo de diferentes condições para o crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> no meio de produção.....	82
4.2.6.1	Efeito de diferentes fontes de carbono.....	82
4.2.6.2	Efeito da proporção de hidrolisado de milho moído e glicerol no crescimento de <i>Cupriavidus necator</i>	83
4.2.6.3	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio.....	83
4.2.6.4	Efeito da fonte suplementar de nitrogênio e nutrientes.....	83
4.2.6.5	Influência de diferentes relações carbono:nitrogênio (C:N) sobre o acúmulo de PHB.....	84
4.2.7	Primeira etapa de otimização da produção de PHB - Planejamento experimental Plackett-Burman para <i>screening</i> de variáveis significativas...	84
4.2.8	Segunda etapa de otimização da produção de PHB - Planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional para otimização das condições do meio de produção.....	85
4.2.9	Cinética da produção de PHB em frascos de Erlenmeyer.....	86
4.2.10	Cinética da produção de PHB em biorreator.....	87
4.2.11	Testes preliminares de diferentes modos de operação para a produção de PHB.....	87
4.2.11.1	Sacarificação e fermentação simultâneas.....	87
4.2.11.2	Batelada alimentada.....	89
4.2.12	Testes preliminares de extração de PHB.....	90
4.2.13	Elaboração de biofilme de PHB.....	91
4.2.14	Métodos analíticos.....	91
4.2.15	Análises estatísticas.....	93
4.3	Resultados e discussão.....	93
4.3.1	Caracterização do glicerol residual.....	93
4.3.2	Crescimento do inóculo em diferentes condições.....	93

4.3.1.1	Efeito de diferentes fontes de carbono.....	93
4.3.2.2	Avaliação do potencial de substituição do extrato de levedura por milhocina.....	95
4.3.3	Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento do microrganismo no meio de fermentação.....	96
4.3.4	Efeito de diferentes proporções entre hidrolisado de milho moído e glicerol no crescimento do microrganismo.....	98
4.3.5	Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento do microrganismo.....	99
4.3.6	Avaliação do potencial de substituição do extrato de levedura por milhocina.....	100
4.3.7	Efeito de diferentes relações C:N no crescimento do microrganismo e no acúmulo de PHAs.....	102
4.3.8	Otimização da composição do meio de produção.....	104
4.3.8.1	Primeira etapa de otimização - Planejamento experimental Plackett-Burman (PB) para o <i>screening</i> de variáveis significativas.....	104
4.3.8.2	Segunda etapa de otimização - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização das variáveis selecionadas.....	108
4.3.9	Cinética de crescimento do microrganismo e produção de PHB em frascos de Erlenmeyer.....	116
4.3.10	Cinética de crescimento do microrganismo e produção de PHB em biorreator de bancada.....	118
4.3.11	Resultados preliminares de diferentes modos de operação.....	122
4.3.11.1	Sacarificação e fermentação simultâneas.....	122
4.3.11.2	Batelada alimentada.....	124
4.3.12	Resultados preliminares de diferentes modos de extração e da elaboração de biofilmes de PHB.....	126
4.3	Conclusões.....	129
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	131
7	REFERÊNCIAS.....	132
8	APÊNDICES.....	160

1. INTRODUÇÃO

Plásticos sintéticos derivados de matriz petroquímica são materiais versáteis, mas que causam um grande dano ambiental devido à sua falta de biodegradabilidade e persistência no ambiente quando descartados (DE GISI et al., 2022). Além disso, o uso excessivo do petróleo gerou uma grande demanda por processos e materiais sustentáveis. Dessa maneira, os bioplásticos – polímeros de origem biológica e que são biodegradáveis – se apresentam como alternativa aos plásticos convencionais por possuírem propriedades físico-químicas similares (MARKL et al., 2018).

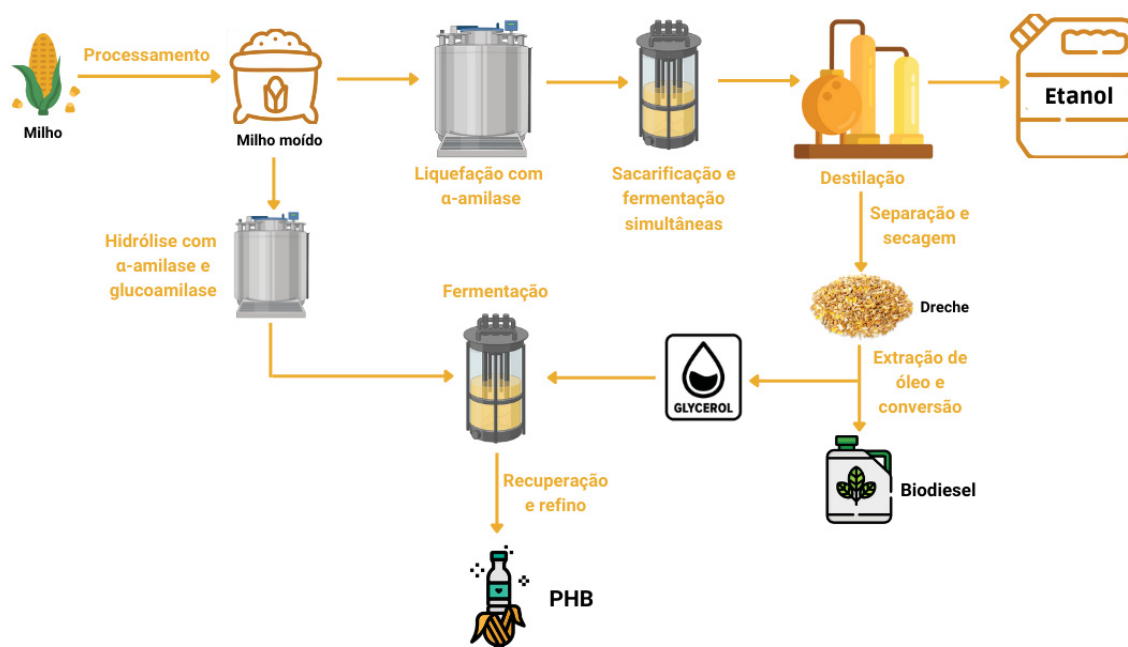
Os polihidroxicanoatos (PHAs) são um grupo de biopolímeros que servem de reserva energética para microrganismos em condições de estresse celular, notadamente o grupo de bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Archaeobacteria*, *Methylobacteria*, *Pseudomonas*, as quais podem aumentar a produtividade em larga escala, através dos processos fermentativos (CAVALHEIRO et al., 2009). Entretanto, a principal problemática da produção de PHAs é o alto custo envolvido no processo, o que impacta diretamente no preço de comercialização de tais biopolímeros. Enquanto plásticos convencionais possuem um preço que varia de aproximadamente 1,10 € (polipropileno) até 1,60 € (etileno acetato de vinila) por quilograma, o preço de PHAs pode chegar até 4 €/kg (NASER et al., 2021). A fonte de carbono escolhida para o processo de produção dos bioplásticos é responsável por cerca de 50% dos custos (KIM, 2000). Dessa maneira, a utilização de substratos alternativos, tais quais produtos da agroindústria ricos em polissacarídeos, nos processos fermentativos pode reduzir o custo de produção, tornando os bioplásticos mais competitivos e acessíveis. Além disso, a integração da produção de PHAs em indústrias e processos já estabelecidos, como os de bioetanol e biodiesel, pode ser uma alternativa vantajosa para a geração de tais biomoléculas (KUMAR; KIM, 2018).

O Brasil é conhecido mundialmente por sua alta atividade agroindustrial, sendo um grande produtor de diversas variedades agrícolas. Dentre eles destacam-se a soja, a cana-de-açúcar – *commodities* nas quais o país detém o pioneirismo no volume de produção (STATISTA, 2022; UNICA, 2022) – e o milho, que podem ser aplicados para a obtenção de diversas biomoléculas. O bioetanol

nacional é produzido principalmente a partir de derivados da cana-de-açúcar. Entretanto, a produção desse combustível tendo como substrato o milho, e subprodutos do seu processamento, vem crescendo de acordo com a fundação da União Nacional do Etanol de Milho (UNEM) em 2017 (UDOP, 2022). Já o biodiesel é produzido principalmente a partir do óleo de soja. Contudo, o óleo de milho pode ser usado principalmente quando extraído de subprodutos como o dreche (resíduo sólido da produção de bioetanol a partir de milho moído), tornando o processo viável (VELJKOVIĆ et al., 2018; LI et al., 2019). Além disso, durante o processo de recuperação do biodiesel, gera-se grandes quantidades de glicerol (10 kg de glicerol a cada 100 kg de biodiesel produzido), o qual geralmente é considerado um fardo ambiental e de difícil manejo (LEONETI et al., 2012).

Propõe-se, dessa maneira, um processo de produção de PHAs a partir de uma combinação de substratos – hidrolisados de milho moído e glicerol residual –, abrindo a possibilidade da concepção de uma biorrefinaria multiprodutos, conforme demonstrado na FIGURA 1.1.

FIGURA 1.1 – PROPOSTA DE INTEGRAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA COM BIOCOMBUSTÍVEIS



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: O polihidroxibutirato (PHB) faz parte da família dos PHAs, sendo o mais comumente produzido e que foi visado durante o presente trabalho.

1.1. Justificativa

O grande volume de resíduos plásticos encontrados no ambiente reitera a busca por alternativas sustentáveis de processos e produtos. A produção de PHAs, mais especificamente o polihidroxibutirato (PHB), a partir de substratos alternativos ricos em polissacarídeos e outros nutrientes, favorece a redução de custos da produção de bioplásticos e sua consequente aplicação em substituição aos polímeros convencionais.

O uso de substratos produzidos em território nacional, como o milho moído e o glicerol residual derivado da produção de biodiesel, fomenta a independência de processos internacionais e abre a oportunidade de estabelecimento do Brasil como um *player* competitivo na produção de bioplásticos.

Ainda, o uso de tais substratos na manufatura de PHB gera a possibilidade de integração de processos com a indústria de biocombustíveis – mais especificamente as de bioetanol e biodiesel – com o conceito de uma biorrefinaria, valorizando assim o desenvolvimento e comercialização de bioprodutos sustentáveis quando comparado aos seus correspondentes convencionais.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral é o desenvolvimento de um bioprocesso para a obtenção de PHB a partir de hidrolisados de milho moído e glicerol residual, levando em conta aspectos econômicos, ambientais e de produtividade.

1.2.2. Objetivos específicos

- Obter hidrolisados da fração amilácea do milho moído com o uso de enzimas amilolíticas e comparar com hidrólise ácida;
- Utilizar hidrolisados obtidos para o cultivo de microrganismos produtores de PHB;
- Comparar diferentes condições físico-químicas de cultivo de microrganismos produtores de PHB;

- Otimizar a produção de PHB a partir dos hidrolisados do milho moído e de glicerol;
- Otimizar os fatores do processo de produção de PHB (composição do meio, relação C/N, condições de agitação e pH);
- Comparar métodos de operação para a produção de PHB (batelada, batelada alimentada e fermentação simultânea);
- Realizar estudo da cinética de produção de PHB nas condições otimizadas em frascos de Erlenmeyer e biorreator do tipo STR de bancada;
- Recuperar o PHB produzido com diferentes métodos de extração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução

O impacto da atividade humana no meio ambiente tem sido um tema de discussão constante em anos recentes. Dentre as várias preocupações existentes está o uso indiscriminado do petróleo para a produção de combustíveis e outros produtos de uso diário, o que gerou uma grande dependência dessa fonte fóssil. Por ser não renovável, tal recurso tem se tornado escasso, causando instabilidade e volatilidade constantes no mercado. Além disso, combustíveis como a gasolina e o diesel, importantes para a matriz energética mundial, são os principais derivados do petróleo (PETROBRAS, 2022) e sua queima gera gases que contribuem para a evolução do cenário preocupante de aquecimento global e efeito estufa (NICOLETTI et al., 2015).

Ademais, em refinarias de petróleo, plásticos são produzidos em conjunto dos combustíveis. Tais materiais apresentam características de flexibilidade, versatilidade, durabilidade e baixo custo para manufatura, o que tornou-os essenciais tanto para aplicações diárias, em embalagens e artigos de uso único por exemplo, quanto industriais para sistemas elétricos, em automóveis, construção civil, dentre outros. Todavia, as características que fazem com que os plásticos sejam amplamente comercializados são as mesmas que os tornam um grande fardo ambiental. Sua versatilidade, flexibilidade e baixo custo geram uma ampla gama de aplicações e, conseqüentemente, uma alta produção que dê suporte à tal demanda. É estimado que, durante os anos 1960, cerca de 50 megatoneladas (Mt) de plástico eram produzidas por ano (LAW, 2017). Em 2019, foram reportadas 460 Mt produzidas no ano (OECD, 2022), representando um crescimento expressivo e considerável em 60 anos.

A durabilidade dos plásticos aliada a um sistema de manejo que não suporta a quantidade de resíduos gerada leva ao problema de descarte e persistência no meio ambiente desses materiais. Em 2015, por exemplo, menos de 4% do resíduo de embalagens plásticas foi reciclado (ROSENBOOM et al., 2022). É estimado também que cerca de 10 Mt de resíduos plásticos são depositados no oceano a cada ano, gerando problemas de ilhas de plástico no ecossistema (FAVA, 2022).

Durante a sua lenta degradação, tais materiais liberam compostos nocivos ao meio ambiente, como aditivos metálicos e ftalatos (TURNER; FILELLA, 2021).

Entretanto, com o crescimento e desenvolvimento populacional estimado, a demanda por energia e materiais continuará a aumentar nos próximos anos. Dessa maneira, o cenário retratado levou governos de diferentes países, empresas e instituições de pesquisa a buscarem por alternativas que pudessem mitigar os efeitos da atividade humana no ambiente, fazendo com que o conceito de bioeconomia fosse difundido. Dentre as mais diversas definições desse termo, a bioeconomia é geralmente definida pelo uso de fontes renováveis como matéria prima, principalmente os seus subprodutos, para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado (BRÖRING et al., 2020). Assim, a sociedade está testemunhando a transição de uma economia linear para uma circular, onde recursos renováveis são aplicados para a produção de diversos produtos. Os resíduos obtidos durante o processo reintegram o ciclo através do reuso, caracterizando um sistema de biorrefinaria.

Um dos bioprodutos que pode ser obtido dentro desses sistemas de utilização de substratos renováveis são os polihidroxialcanoatos (PHAs), os quais são polímeros biodegradáveis acumulados de modo intracelular em microrganismos que possuem reserva energética (POLI et al., 2011). Em bactérias, os PHAs são gerados em condições desbalanceadas de cultivo (CAVALHEIRO et al., 2009), como limitação de nutrientes e excesso de fonte de carbono (MUHAMMADI et al., 2015). Dentre os PHAs, o polihidroxibutirato (PHB) se destaca por ser biocompatível e não-tóxico, além de apresentar propriedades similares ao polipropileno o que o torna um potencial substituto para tais materiais (CHEN; DAVIS, 2002). Embora esses biopolímeros apresentem diversas vantagens, seu alto custo de produção ainda retarda sua ampla aplicação e desencoraja a substituição de plásticos petroquímicos por PHB bacteriano (ELSAYED et al., 2016). Na perspectiva de reduzir custos, é possível integrar a produção de PHAs com outros bioprodutos empregando o conceito de biorrefinaria já mencionado.

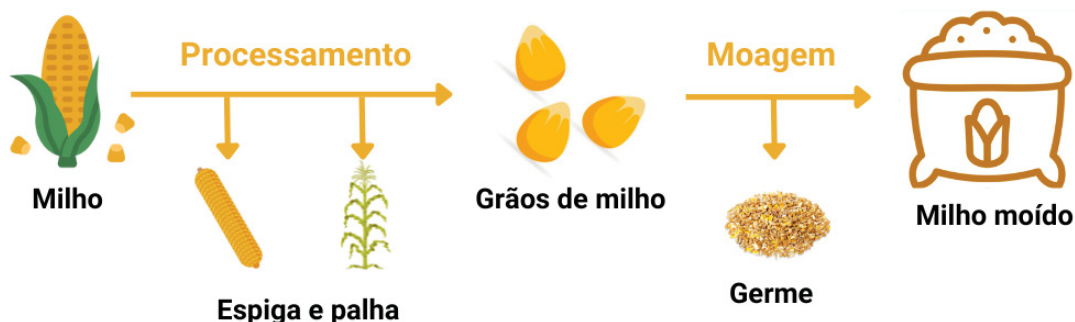
O estabelecimento de sistemas de produção de múltiplas biomoléculas derivados de substratos alternativos e renováveis promove o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis, desse modo favorecendo a comercialização dos produtos obtidos, suscitando a possibilidade da substituição da matriz petroquímica convencional. Dentre os substratos que podem ser aplicados em biorrefinarias,

estão os produtos ricos em polissacarídeos derivados da agroindústria, como a soja, a cana-de-açúcar e o milho (AKAO et al., 2016). Sistemas de produção de bioetanol já são bem estabelecidos para a cana, principalmente no Brasil (KARP et al., 2021), e para o milho, tanto nos Estados Unidos quanto no Brasil (RENEWABLE FUEL ASSOCIATION, 2022a). Entretanto, por ser uma molécula com alta demanda, seu preço de comercialização é geralmente baixo, fazendo com que diversas usinas não consigam se sustentar tendo o bioetanol como único produto (GOMBERT; MARIS, 2015). Assim, a integração de processos de produção de bioetanol com outras biomoléculas, como o biodiesel (que gera glicerol residual, o qual pode ser também destinado como substrato para outros produtos) e PHAs é vantajosa, gerando um sistema de biorrefinaria, sendo uma boa alternativa para usinas produtoras de tal biocombustível.

2.2. Biorrefinaria de milho

O milho é um produto agrícola derivado originalmente da América Central, mas atualmente é produzido em diversos países. Os Estados Unidos são o maior produtor dessa *commodity*, com uma produção anual de cerca de 367,3 milhões de toneladas. A China, com 271 milhões de toneladas anuais, o Brasil se encontra em terceiro lugar com 126 e a União Européia com 68 também se destacam pela sua grande atividade agroindustrial, sendo as maiores contribuições provenientes da França e de países do leste europeu (INDEX MUNDI, 2022). O milho moído é a forma disponível como produto final do processamento deste produto agrícola, possui potencial de uso como substrato para bioprocessos, e atualmente, é destinado principalmente para a aplicação na indústria de etanol de primeira geração. O processamento do milho gera diversos subprodutos que podem ser explorados em diferentes processos (FIGURA 2.1). A palha e as espigas de milho são materiais ricos em lignocelulose (AKAO et al., 2016; DU et al., 2020), diversos tratamentos já foram desenvolvidos para a recuperação dos açúcares redutores para seu futuro uso em processos fermentativos e obtenção de biomoléculas com alto valor agregado, gerando cadeias de valorização de materiais que seriam considerados resíduos (AKAO et al., 2016; DU et al., 2020). Notoriamente, os países que possuem grande produção de milho são também os maiores produtores de bioetanol dessa fonte (RENEWABLE FUEL ASSOCIATION, 2022a).

FIGURA 2.1 – PROCESSAMENTO DO MILHO



Fonte: A autora (2022)

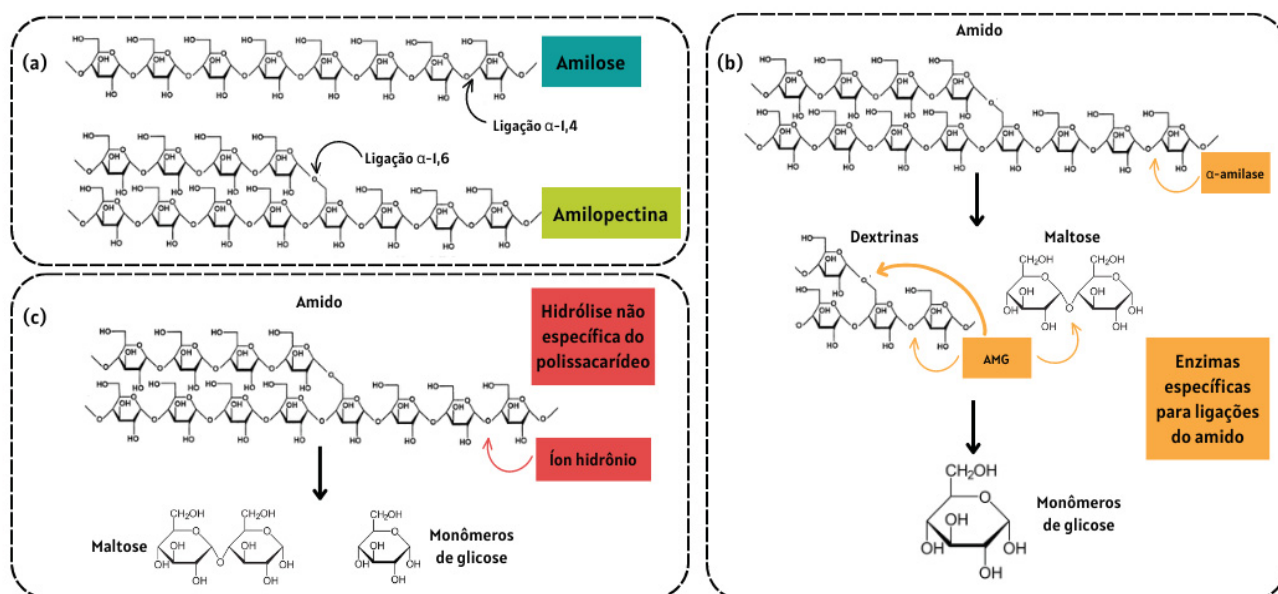
Para a produção de bioetanol de primeira geração, a fração do milho utilizada é a amilácea, que corresponde a até 78% da composição do substrato (ZHANG et al., 2021). O amido é a principal reserva de carboidrato de diversas plantas e legumes, servindo também como fonte de energia para diferentes organismos e como um importante material para a indústria. Ele é constituído de unidades monoméricas de glicose ligadas por ligações α -1,4 (gerando o polímero amilose, que contém cerca de 1000 monômeros), ou α -1,4 e ramificações com α -1,6 (o que forma a amilopectina, um polímero com ramificação a cada 20 unidades de glicose) (MIAO et al., 2015; HUANG et al., 2021) (FIGURA 2.2a). Por ser um polissacarídeo, o amido não é naturalmente metabolizado pela maioria dos microrganismos de interesse como bactérias e leveduras. Dessa maneira, faz-se necessária a hidrólise do amido previamente à fermentação.

O método enzimático da hidrólise do amido é o mais consolidado e ocorre em duas etapas com diferentes enzimas (FIGURA 2.2b). A primeira etapa, conhecida por cozimento ou liquefação, ocorre com a enzima α -amilase (EC 3.2.1.1) que é responsável por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido, atuando na estrutura interna da molécula e liberando oligossacarídeos de glicose como dextrinas e maltose (SMITH et al., 2010). Já a segunda etapa, a sacarificação, ocorre com a enzima glucoamilase ou amiloglucosidase (AMG, EC 3.2.1.3) a qual pode hidrolisar ligações nos terminais redutores com ligações α -1,4 e α -1,6 dos oligossacarídeos liberados na primeira etapa, por sua vez liberando monômeros de glicose que poderão então ser metabolizados pelos microrganismos produtores das mais diversas moléculas conforme demonstrado na Figura 2.2 (BIJTTEBIER et al.,

2008). As enzimas α -amilase são geralmente termoestáveis, podendo atuar a temperaturas de 85 a 165°C (SCHWIETZKE et al., 2009). Já as enzimas AMG possuem temperaturas mais brandas de atuação, com uma faixa que varia entre 30 a 65°C, geralmente com temperatura ótima de 60°C (BENASSI et al., 2013). Essa ampla faixa de temperatura permite a aplicação dessas enzimas em processos fermentativos em modo de operação de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), em que a liberação de açúcares ocorre concomitantemente com o processo de fermentação, podendo ser aplicados para a produção de diversas biomoléculas, incluindo o bioetanol (DEVOS; COLLA, 2022).

Além da hidrólise enzimática, ácidos como H_2SO_4 , HCl , HNO_3 e H_3PO_4 podem ser aplicados para a hidrólise do amido de milho moído. Neste processo, o íon hidrônio (H_3O^+) ataca o oxigênio da ligação glicosídica, fazendo com que ela se quebre e as unidades de glicose sejam liberadas (PRATIWI et al., 2017) (FIGURA 2.2c). Entretanto, diferentemente da hidrólise enzimática, este processo não é específico e pode desencadear outras reações na estrutura de polissacarídeos do milho, como a solubilização de parte da hemicelulose (DE VASCONCELOS et al., 2013).

Figura 2.2 – (a) ESTRUTURA DO AMIDO COM SEUS POLISSACARÍDEOS AMILOSE E AMILOPECTINA (b) HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO AMIDO (c) HIDRÓLISE COM CATALISADOR ÁCIDO DO AMIDO



Fonte: Adaptado de ROBYT (2008); SIROHI et al. (2020); HARUN et al. (2022)

Com os açúcares liberados no meio aquoso, é possível realizar a fermentação para a obtenção de diferentes biomoléculas. No caso do bioetanol, leveduras alcoólicas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* realizam esse processo com altos rendimentos e produtividade (PULIGUNDLA et al., 2019). A produção de bioetanol também gera subprodutos, os quais podem ser reutilizados em outros processos, criando assim sistemas de biorrefinaria, ou como aditivos de ração animal (PECKA-KIEŁB et al., 2017). A estrutura e tecnologia existentes em usinas para a produção de bioetanol poderiam ser reaproveitadas para a produção de outras biomoléculas com maior valor agregado, viabilizando os diferentes processos.

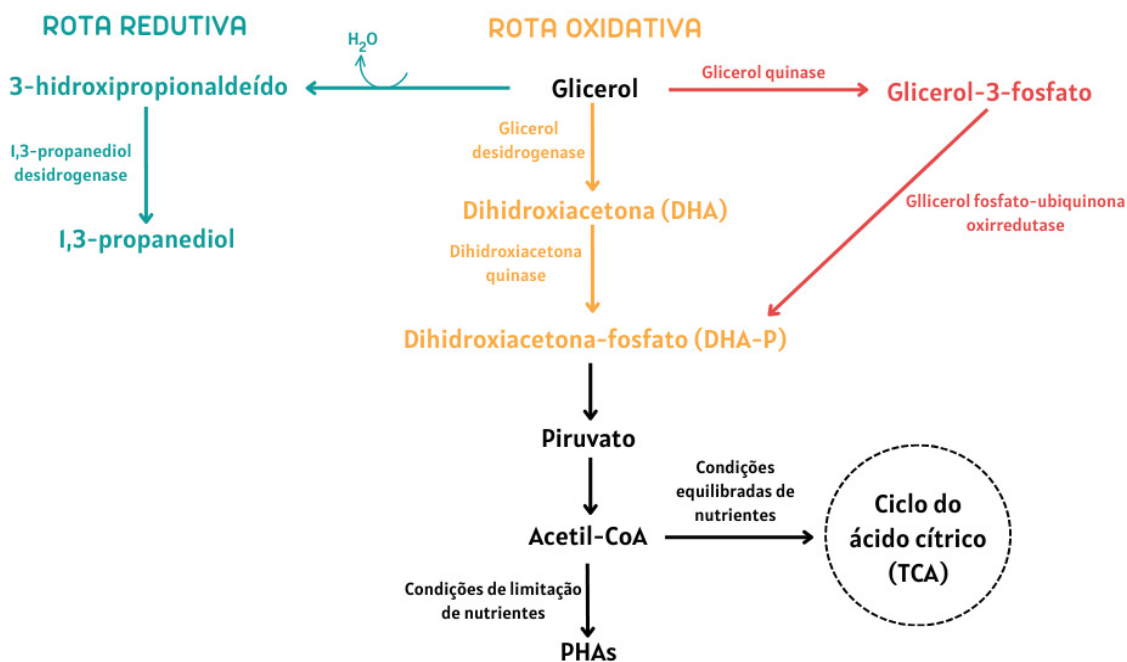
2.3. Glicerol

O glicerol (também referenciado como glicerina) é um subproduto da geração e recuperação do biodiesel. Para cada 10 kg do biocombustível produzido, cerca de 1 kg de glicerol é gerado (YANG et al., 2012). Mundialmente, o mercado desse produto foi avaliado em 2,4 bilhões de dólares em 2020 (GRAND VIEW RESEARCH, 2022), com uma produção estimada de 4,2 milhões de toneladas. Dessas, estima-se que seriam utilizadas cerca de 3,5 milhões de toneladas para os mais diversos fins, ainda gerando um excesso de tal resíduo sem destino definido (LI et al., 2018). No Brasil, no mesmo ano, foram produzidas cerca de 640 mil toneladas, sendo que 50% desse volume foi exportado. Entretanto, com a queda constante do preço do glicerol, o uso dele para diversas aplicações tem atraído mais atenção do que a sua venda (NOMANBHAY et al., 2018; RAMOS et al., 2022).

O glicerol bruto derivado da produção de biodiesel pode apresentar compostos como íons, metanol e ácidos graxos, os quais precisam ser retirados para aplicações que requerem o glicerol em alta pureza (SANTIBÁÑEZ et al., 2011; LUO et al., 2016). Aplicações em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentícias podem utilizar o glicerol como umectante a fim de conferir diferentes texturas para os produtos, além de controlar a atividade de água e assim aumentar a sua vida de prateleira (AZELEE et al., 2019). Entretanto, o processo de refino e purificação do glicerol para tais aplicações é longo e custoso, e, dessa maneira, pode não se apresentar como uma alternativa economicamente viável para indústrias de biodiesel, principalmente de pequeno e médio porte (LUO et al., 2016).

Todavia, em processos químicos ou fermentativos para a produção de moléculas de médio a alto valor agregado, o refino do glicerol não se faz necessário, podendo-se assim aplicar tal subproduto diretamente como substrato para a produção de diversos produtos, como butanol, 1,3-propanediol, ácidos orgânicos, polímeros, lipídios, dentre outros (LUO et al., 2016). Em processos fermentativos com uso de microrganismos, o glicerol pode ser assimilado por duas rotas metabólicas principais, a redutiva e a oxidativa. (FIGURA 2.3). Na rota redutiva, ele é desidratado para 3-hidroxi-propanal, o qual é então convertido em 1,3-propanediol por ação de uma desidrogenase (MARTINS-PINHEIRO et al., 2016). Já pela rota oxidativa, o glicerol é convertido em dihidroxiacetona (DHA) pela ação da glicerol desidrogenase. A DHA passa então pela reação com DHA-quinase que a converte em DHA-fosfato (DHA-P) (MARTINS-PINHEIRO et al., 2016). O glicerol pode ser convertido em DHA-P através da reação sequencial com as enzimas glicerol quinase (a qual gera glicerol-3-fosfato) e glicerol fosfato-ubiquinona oxirredutase (NASCIMENTO et al., 2016). O DHA-P, por sua vez, sofre diversas reações em cadeia gerando piruvato como produto final (AMARAL et al., 2009). A partir dele, produtos como lactato e 2,3-butanediol podem ser sintetizados. Entretanto, o piruvato também pode ser convertido em Acetil-CoA por oxidação, o que possibilita um amplo espectro de moléculas que podem ser produzidas (MAILLOUX, 2015). Dentre elas estão o acetato, o etanol e os polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs são produzidos como reserva energética por certos microrganismos em condições de desbalanço de nutrientes, em que a rota metabólica é desviada do ciclo natural do ácido cítrico (TCA) para a produção dos biopolímeros (NASCIMENTO et al., 2016).

FIGURA 2.3. ROTAS METABÓLICAS DE ASSIMILAÇÃO DO GLICEROL



Fonte: A autora (2022)

A produção de outras biomoléculas a partir do glicerol pode ser uma boa alternativa para o uso desse subproduto em indústrias de biodiesel, uma vez que a estrutura presente pode ser reaproveitada para a manufatura dos novos bioprodutos. Além disso, a não necessidade do refino do glicerol e os lucros obtidos pela comercialização dos produtos obtidos tornam tal alternativa mais economicamente viável para certos casos. Ademais, a integração de produção de biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel, com outras moléculas como ácidos orgânicos e polímeros contribui para o desenvolvimento do conceito e aplicação de biorrefinarias, criando assim plataformas multi produtos que se utilizam dos resíduos gerados em um processo para a manufatura de novas biomoléculas.

Conforme mencionado, os PHAs podem ser obtidos em processos fermentativos utilizando o glicerol bruto como substrato, como já demonstrado em literatura com destaque para os resultados obtidos em sistemas de batelada alimentada com alta densidade celular. Mothes e colaboradores (2007), utilizaram o glicerol bruto com cloreto de sódio residual (5,5%) como substrato, e 50 g/L de biomassa foi gerada com 48% de acúmulo de PHB. O mesmo sistema foi utilizado por Cavalheiro e colaboradores (2009), onde 68,8 g/L de biomassa final foi obtida

com 38% de acúmulo de biopolímero. A aplicação do glicerol como substrato em um sistema de biorrefinaria auxilia na redução de custos de produção de PHAs, atribuídos à fonte de carbono. Além disso, por ser uma molécula com alto teor de carbono, o glicerol auxilia no aumento da relação C:N (SANTIBÁÑEZ et al., 2011), necessária para o estresse metabólico que gera o acúmulo dos biopolímeros.

2.4. Polihidroxialcanoatos

2.4.1. Contexto histórico

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) foram observados pela primeira vez como grânulos intracelulares de células bacterianas pelo microbiologista holandês Martinus Beijerinck em 1888 (RATHNA et al., 2016). Entretanto, somente após mais de 30 anos foram devidamente extraídos e caracterizados pelo cientista francês Maurice Lemoigne no ano de 1923. Ele foi capaz de recuperar o polihidroxibutirato (PHB) de células de *Bacillus megaterium* pela primeira vez, iniciando assim estudos de caracterização (KESHAVARZ; ROY; 2010). Já em 1958, os cientistas Macrae e Wilkinson elucidaram o papel metabólico do PHB em bactérias *B. cereus* e *B. megaterium*, observando o acúmulo deste composto quando a relação entre carbono e nitrogênio (C:N) era mantida alta e a degradação do polímero no momento em que a fonte de carbono se tornava ausente no meio (MACRAE; WILKINS; 1958; PALMEIRO-SÁNCHEZ et al., 2022). Tais avanços permitiram o primeiro depósito de patente em 1962 que reivindicava o uso do PHB como substituto de plásticos convencionais.

Com a crise do petróleo nos anos 1970, alternativas aos materiais plásticos começaram a ser mais pesquisadas e desejadas e as primeiras tentativas da produção industrial de PHAs iniciaram-se durante os anos 1980. Em 1989, fundou-se a Novamont, uma fábrica italiana para a produção de PHAs. A partir daí, novas indústrias foram fundadas e consolidadas, como as americanas Metabolix em 1992 e Danimer Scientific em 2007 (SABAPATHY et al., 2020). No Brasil, destaca-se a fundação da PHB industrial nos anos 2000 (INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2012). Nos dias atuais, a iminente escassez do petróleo gera instabilidade no mercado e o fardo ambiental causado pelos plásticos convencionais

são os principais impulsionadores para o desenvolvimento de processos de produção de PHAs com altas produtividades e baixos custos.

2.4.2. Produção e mercado

Com a alta demanda de substitutos para plásticos de origem petrolífera, os bioplásticos surgem como alternativa de material. Estima-se que em 2021, cerca de 2,4 milhões de toneladas de tais materiais foram produzidas, sendo que os PHAs detinham 2% dessa produção, equivalente a 43 mil toneladas (EUROPEAN BIOPLASTICS, 2022). Apesar de englobar uma pequena fração da produção geral dos bioplásticos, a geração de PHAs se encontra em um momento de expansão, com perspectiva de produção de até 500 mil toneladas para 2026 – correspondente a um aumento de 10 vezes em 5 anos (KOLLER, 2022). O mercado de PHAs foi avaliado em aproximadamente 170 milhões de dólares em 2020, com uma projeção de crescimento de 9,2% ao ano (CAGR), sendo assim estimado para 440 milhões em 2031 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2022). A região que possui o maior mercado é a europeia, principalmente devido às legislações mais rígidas em vigor nesta região quanto à redução do uso de plásticos convencionais, o que incentiva o desenvolvimento e pesquisa dos materiais alternativos (MARKETS AND MARKETS, 2022).

Os principais fatores que restringem o mercado de PHAs são o alto preço de produção quando comparados a outros materiais, e ao fato de que a tecnologia ainda está em sua fase inicial de desenvolvimento (MARKETS AND MARKETS, 2022). Um grande volume de pesquisa ainda está sendo conduzido para a produção de PHAs a partir de diferentes substratos, com cepas recombinantes e para a recuperação com alto rendimento e de maneira sustentável. Entretanto, algumas indústrias conseguiram se estabelecer diante desse cenário com processos de boa performance (TABELA 2.1). Além dos esforços de produção de PHAs com cepas únicas, o desenvolvimento da produção destes biopolímeros em sistemas de tratamento de água residual com culturas mistas de bactéria (referenciado como *mixed microbial culture* ou MMC) também vem se estabelecendo em escala piloto. Destacam-se as empresas Paques Biomaterials (PAQUES BIOMATERIALS, 2022), que estabeleceu, pelo menos, 5 plantas piloto para a produção de polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV) em sistemas de MMC e a Veolia Wastewater,

a qual implementou um projeto piloto em Bruxelas, na Bélgica, para a produção de PHAs em conjunto com o tratamento de água municipal (MORGAN-SAGASTUME et al., 2015).

TABELA 2.1 – EMPRESAS PRODUTORAS DE PHAS AO REDOR DO MUNDO

Empresa	País	Tipo de PHA	Nome do produto	Capacidade de produção (ton/ano)
Biomatera	Canadá	Resinas de PHA	Biomatera	N.D.
Biomer	Alemanha	Pellets de PHB e esferas de PHBV	Biomer ®	500
Bio-On	Itália	Esferas de PHB e PHBV	minerv ®-PHA	10000
Danimer Scientific	EUA	PHAs de cadeia média	Nodax ®	13600
Kaneka	Japão	PHB-PHHx*	Aonilex ®	1000 - 3500
Newlight Technologies	EUA	Resinas de PHA	AirCarbon ®	23000
PHB Industrial	Brasil	PHB e PHBV	Biocycle ®	500 - 3000
PolyFerm	Canadá	PHAs de cadeia média	VersaMer ®	< 10
TianAn Biopolymers	China	PHB e PHBV	Enmat ®	10000
Tianjin GreenBio Material	China	PHB	SoGreen ®	10000

*Polihidroxi-butirato-polihidroxi-hexanoato

Adaptado de KOURMENTZA et al. (2017) e VANDI et al. (2018)

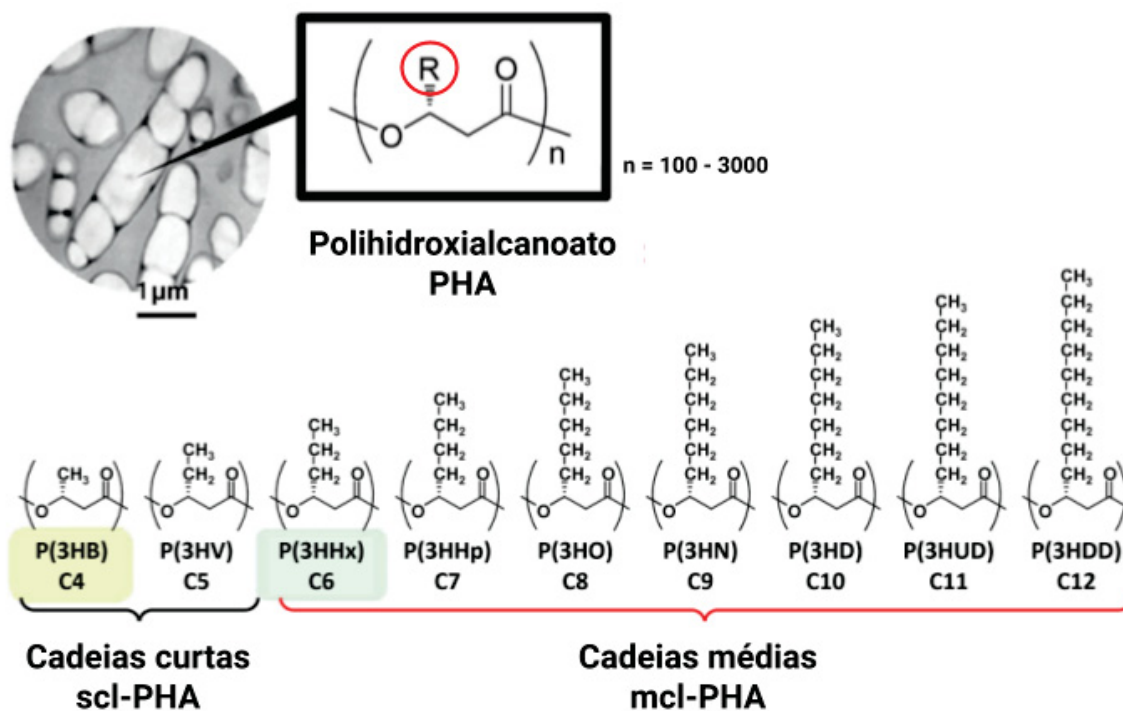
2.4.3. Classificação de PHAs

Os PHAs são poliésteres compostos de monômeros de hidroxialcanoatos ou ácidos hidroxialcanoicos, sendo que cerca de 150 diferentes monômeros já foram

identificados na formação desses polímeros (ALVES et al., 2022; WANG et al., 2014). Dessa maneira, as características de cada tipo de PHA pode variar com a sua composição monomérica, criando uma família de biopoliésteres que possuem uma vasta gama de aplicações. Entretanto, como propriedades gerais, os PHAs são termoplásticos biodegradáveis, que apresentam biocompatibilidade e são produzidos e polimerizados biologicamente, geralmente por bactérias (LAYCOCK et al., 2013).

Os PHAs podem ser classificados de acordo com a quantidade de carbonos em seus monômeros, de forma que aqueles que apresentam entre 1-5 carbonos são os PHAs de cadeia curta (scl-PHAs), os que possuem 6-14 C são os PHAs de cadeia média (mcl-PHAs) e aqueles que têm entre 15 a 18 C são os PHAs de cadeia longa (lcl-PHAs) (PRIYADARSHI et al., 2014). Os scl e mcl-PHAs são os mais comumente produzidos por microrganismos (MUNEER et al., 2020), sendo que mcl-PHAs possuem propriedades mecânicas melhores do que os scl-PHAs, apresentando maior flexibilidade e podendo ser considerado elastômeros, ideais para aplicações biomédicas (RAZA et al., 2017). A variação no número de carbonos dos monômeros se encontram nas regiões “R” (que equivale ao radical) e “n” (número de repetições de CH₂ da molécula) (FIGURA 2.4). É possível obter também copolímeros com diferentes unidades formadoras do biopoliéster, como é o caso do PHBV, que possui hidroxibutirato e hidroxivalerato como monômeros. A indução de formação desses copolímeros é feita através de modulação de rota metabólica, seja pela mudança de substrato inicial ou por engenharia genética para obtenção dirigida de PHAs (TAGUCHI; DOI, 2004).

FIGURA 2.4. ESTRUTURA GERAL DE PHAS E EXEMPLOS DE scl-PHAs e mcl-PHAs



Fonte: Adaptado de TAGUCHI E MATSUMOTO (2020)

O polihidroxibutirato (PHB) é considerado um polímero de cadeia curta e é o PHA mais comumente produzido. As suas propriedades se assemelham às do polipropileno (PP) e ao politereftalato de etileno (PET) (TABELA 2.2), podendo assim ser um substituto desses plásticos convencionais. As principais características que diferem o PHB são a sua maior rigidez e menor flexibilidade quando comparado ao PP (MARKL et al., 2018).

TABELA 2.2 – PROPRIEDADES DO PHB QUANDO COMPARADO À PLÁSTICOS CONVENCIONAIS

Polímero/Propriedades	PHB	PP	PET
Densidade (g cm ⁻³)	1.18 – 1.30	0.905	1.38
<i>Elongation at break</i> (%)	5 – 1014	400	600
Temperatura de transição vítrea [T_g (°C)]	(-50) – 4	-10	67 – 80
Temperatura <i>melting</i> [T_m (°C)]	53 – 180	176	255 – 265
Módulo de Young (GPa)	0.2 – 3.5	1.7	2.8 – 3.5
Resistência à tração (MPa)	3 – 104	38	60 – 85.5

Adaptado de GUO et al. (2022), DHAKA et al. (2022), FARAH et al. (2016).

2.4.4. Biossíntese de PHAs

Os PHAs são biopoliésteres produzidos por diversos organismos, tanto procaríotos quanto eucaríotos, de maneira intracelular como uma inclusão lipídica servindo de reserva energética para as células. Plantas transgênicas são uma das fontes eucarióticas de PHAs, sendo capazes de produzir o biopolímero junto dos outros componentes celulares como amido, lignocelulose e pectina. O primeiro registro de PHAs sendo produzidos por plantas é datado dos anos 1990, com a geração de PHB a partir de *Arabidopsis thaliana* com um acúmulo de 0,01% em peso (DOBROGOJSKI et al., 2018). Com o desenvolvimento da engenharia genética para a manufatura de plantas transgênicas, acúmulos de até 40% em peso já foram reportados (TAN et al., 2017).

Entretanto, a produção de PHAs nesse tipo de sistema apresenta dificuldades em relação ao controle do tipo de monômero gerado, e de recuperação dos biopolímeros, além do longo tempo de cultivo necessário para a obtenção do plantio e do biopolímero (DOBROGOJSKI et al., 2018; PHILIP et al., 2007). Dessa maneira, os PHAs são comumente produzidos através de processos fermentativos utilizando bactérias, as quais podem ser Gram positivas ou negativas. Esses organismos produtores são divididos em dois grupos: bactérias que não acumulam PHAs durante sua fase de crescimento e necessitam de limitação de nutrientes –

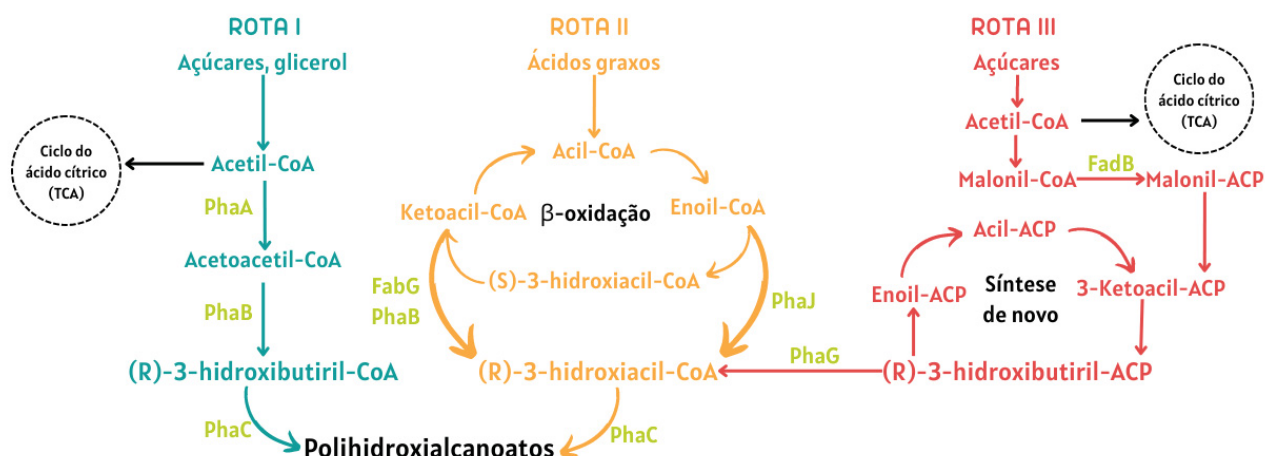
como nitrogênio, fósforo, oxigênio, magnésio, entre outros – para o acúmulo do biopolímero, e organismos que não apresentam esses requerimentos (RAZA et al., 2018). *Cupriavidus necator* (classificado anteriormente como *Ralstonia eutropha* e *Alcaligenes eutrophus*), *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas putida* são exemplos de microrganismos que pertencem ao primeiro grupo (MUHAMMADI et al., 2015). Os microrganismos recombinantes, como *Escherichia coli*, pertencem ao segundo grupo, junto do *Alcaligenes latus* (MUHAMMADI et al., 2015). As bactérias produtoras de PHAs são capazes de assimilar diversas fontes de carbono, tais como açúcares simples, glicerol, hidrolisados de substratos amiláceos e lignocelulósicos, óleos vegetais e residuais, e ácidos graxos voláteis (VFAs). Esses microrganismos podem alcançar uma alta produção de biopolímero, correspondendo até 90% de seu peso celular (PASSANHA et al., 2013).

Outro sistema de produção de PHAs envolve o uso de culturas mistas de organismos, geralmente acoplado a estações de tratamento de água residual de processos ou municipais. Esses sistemas são abertos e não estéreis. Condições externas de estresse celular são geralmente aplicadas para a seleção dos organismos produtores de PHA. As principais vantagens desses sistemas são o uso de substratos de baixo valor, geralmente até de valor “nulo” por se tratar de água residual, e a não necessidade de esterilização, o que também reduz custos operacionais (SALEHIZADEH; VAN LOOSDRECHT, 2004). A produtividade e rendimento desses sistemas tendem a ser menores comparados ao uso de culturas puras, além do tempo de operação ser maior o que pode aumentar os custos de manutenção (TU et al., 2019). A produção de PHAs a partir de bactérias halófilas dos gêneros *Halomonas* e *Haloferax* também permite a não esterilização inicial do meio para produção de PHAs, visto que a quantidade de sal necessária para o desenvolvimento desses organismos inibe o crescimento de outros, auxiliando na redução do custo de processo (ALVES et al., 2022; LUO et al., 2022). Além disso, para a recuperação dos PHAs produzidos por esses organismos, a lise osmótica pode ser aplicada para rompimento celular (KOURMENTZA et al., 2017; RATHI et al., 2012).

Em termos gerais, a síntese de PHAs em microrganismos pode ocorrer através de 3 rotas metabólicas (FIGURA 2.5). Na rota I, açúcares redutores, glicerol ou outras fontes de carbono são convertidos a acetil-CoA por diferentes processos

metabólicos. A acetil-CoA sofre um desvio de sua rota original (ciclo do ácido cítrico), para a sua conversão em acetoacetil-CoA pela enzima β -ketiolase (*PhaA*), a qual é sequencialmente transformado em (R)-3-hidroxiacetil-CoA pela ação da enzima acetoacetil-CoA redutase (*PhaB*). Esse composto serve então como monômero para a polimerização pela enzima PHA sintase (*PhaC*), formando o PHA de interesse (ALCÂNTARA et al., 2020). Os polímeros obtidos por essa rota são geralmente de cadeia curta (BHOLA et al., 2021). Já na rota II, ácidos graxos são convertidos em (R)-hidroxiacetil-CoA pela via da β -oxidação, os quais são então polimerizados pela *PhaC*. Os poliésteres gerados na rota II são usualmente de cadeia média (SEHGAL; GUPTA, 2020). Por fim, na rota III, a acetil-CoA obtida a partir dos açúcares ou outra fonte de carbono é convertida em malonil-CoA, a qual é sequencialmente transformado em malonil-ACP que entra na rota de síntese de ácidos graxos *de novo* obtendo-se (R)-3-hidroxiacetil-ACP. Esse composto é então convertido em (R)-hidroxiacetil-CoA pela ação da enzima transacetilase (*PhaG*) e, posteriormente, polimerizado em PHA pela *PhaC*, também gerando polímeros de cadeia média (BHOLA et al., 2021).

FIGURA 2.5 – ROTAS METABÓLICAS DA PRODUÇÃO DE PHAs



Fonte: A autora (2022)

Como é possível observar, as rotas de produção de PHAs competem diretamente com rotas metabólicas convencionais dos organismos, sendo assim necessário certa modulação a fim do desvio correto para o acúmulo dos biopolímeros (ALVES et al., 2022). Em organismos geneticamente modificados, as

rotas são manipuladas de acordo com o desejado. Entretanto, em cepas não recombinantes, tal modulação é geralmente feita através do uso de condições limitantes de nutrientes para gerar estresse metabólico. Além disso, alguns meios de cultivo de PHA contêm ácido cítrico em sua composição, o que faz com que não haja necessidade de o microrganismo seguir para a rota do TCA, propiciando melhores condições para o acúmulo do poliéster (ZHANG et al., 2008).

O processo de produção de PHAs em diferentes escalas (de bancada, piloto e industrial) pode ser realizado através de diferentes modos de operação. Em processos do tipo batelada, não há adição ou remoção do meio de cultivo durante a fermentação. Apesar de ser um método de baixa complexidade operacional, ele não permite alcançar alto acúmulo de PHAs, uma vez que a fonte de carbono é exaurida durante o processo, o que pode levar ao consumo do biopolímero pelo microrganismo (AMACHE et al., 2013). O modo de batelada alimentada pode promover um maior acúmulo de biopolímero. No caso mais simples de modo de operação, ou seja em batelada, o microrganismo geralmente cresce até atingir o início da fase estacionária, ou antes. Neste momento, um pulso com novo meio de cultivo (geralmente com alta concentração de fonte de carbono) é realizado a fim de manter uma condição de maior relação C:N com limitação de fonte de nutrientes no processo, mas ainda mantendo uma boa taxa de crescimento do microrganismo (IENCZAK ET AL., 2013). Estratégias de pulso único ou múltiplos pulsos podem ser aplicadas para o modo de operação de batelada alimentada a fim de manter a alta concentração da fonte de carbono no meio de cultivo.

Um problema que pode ser gerado durante o processo da batelada alimentada é a diluição do meio de cultivo por conta do volume de alimentação. Geralmente, as soluções de alimentação utilizadas podem conter alta concentração de fonte de carbono (com registros de até 500 g/L). Entretanto, alguns substratos como *whey* ou próprios hidrolisados de biomassa amilácea ou lignocelulósica não possuem tal concentração de açúcares em sua composição. É possível então aplicar estratégias de ultrafiltração ou evaporação a fim de concentrar os componentes de interesse na solução de alimentação. Entretanto, outros compostos com potencial inibitório podem ser concentrados em conjunto, além de adicionar uma etapa extra no processo, o que pode impactar diretamente no custo final (KOLLER, 2018; KUCERA et al., 2017). Dessa maneira, outras estratégias de batelada alimentada podem ser aplicadas, como é o caso da batelada alimentada

com o reciclo de células, o que auxilia na manutenção da concentração celular no meio, ou da batelada “repetida” alimentada, em que parte do meio fermentado é removido e meio de cultivo novo é inserido no sistema repetidas vezes (IENCZAK et al., 2013; KOLLER, 2018).

Processos contínuos ou quimiostato, em que o substrato é alimentado junto da retirada de meio de cultivo, em uma mesma taxa continuamente ao longo do processo, também podem ser aplicados. Esse tipo de processo é aplicado principalmente em sistemas MMC, permitindo um processo mais estável e com maior possibilidade de adaptação do tipo de PHA produzido pela modulação do tipo de substrato alimentado durante o processo (KOLLER, 2018). Estratégias em único reator, em duas fases ou com reatores em cascata podem ser aplicadas. Os processos de estágio único não apresentam grandes vantagens para a produção de PHAs uma vez que a alimentação contínua de novo meio de cultivo não permite a limitação de nutrientes necessária para o acúmulo dos polímeros (KOLLER, 2018). Em estratégias que possuem mais de um estágio, a biomassa microbiana é produzida em um primeiro reator, o qual opera em modo de alimentação contínua de um novo meio de composição integral. Em sequência, a biomassa é transferida para o segundo reator, o qual opera em modo de alimentação contínua somente da fonte de carbono, sem adição de nutrientes como nitrogênio e fósforo, estabelecendo-se as condições de limitação para o acúmulo de PHAs (MUTHURAJ et al., 2021).

Outro modo de operação que pode ser aplicado para a produção de PHAs é a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), em que o processo de hidrólise enzimática ocorre de maneira concomitante à fermentação pela adição dos catalisadores no meio de cultivo (DEVOS; COLLA, 2022). Tal processo pode ocorrer tanto com biomassa amilácea, pela ação da enzima glucoamilase, ou com lignocelulose, em que um conjunto de enzimas atua para a hidrólise (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016a; DAHMAN; UGWU, 2014). Nesse caso, os açúcares redutores são liberados ao decorrer do processo ao mesmo tempo em que os microrganismos os consomem. A vantagem desse tipo de modo de operação é a redução do tempo de processo geral, uma vez que uma etapa é acoplada a outra, o que pode auxiliar também na redução de custos. A TABELA 2.3 elenca diversos exemplos da literatura de produção de PHAs com diferentes modos de operação e substrato.

TABELA 2.3 – EXEMPLOS DE PRODUÇÃO DA PHAs A PARTIR DE SUBSTRATOS ALTERNATIVOS

Microorganismo	Substrato	Condições de operação	Tipo de PHA	Acúmulo de PHA (%)	Produção de PHA (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Referência
<i>Ralstonia eutropha</i>	Óleo de soja	Batelada alimentada, reator 5L	PHB	76	126	0,997	(KAHAR et al., 2004)
<i>Ralstonia eutropha</i> recombinante	Óleo de soja	Batelada alimentada, reator 5L	PHBHHX	74	138	1,033	(KAHAR et al., 2004)
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicose e glicerol	Batelada alimentada, reator 3L	PHB	62,7	125	1,36	(MOZUMDER et al., 2014)
<i>Cupriavidus necator</i>	Hidrolisado de mandioca	Batelada, frascos de Erlenmeyer	PHB	61,6	2,43	0,038	(POOMIPUK et al., 2014)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Gordura animal residual	Batelada, reator 2,5L	PHB	63,3	24	0,3	(RIEDEL et al., 2015)
<i>Ralstonia eutropha</i> recombinante	Gordura animal residual	Batelada, reator 2,5L	PHBHHX	60	27	0,4	(RIEDEL et al., 2015)
<i>Cupriavidus necator</i>	Melaço de cana e vinhaça	Batelada alimentada, reator 4L	PHB	56	11,7	0,234	(DALSASSO et al., 2019)

CONTINUA

Microrganismo	Substrato	Condições de operação	Tipo de PHA	Acúmulo de PHA (%)	Produção de PHA (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Referência
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolisado de cereal amiláceo	Batelada, reator 2L	PHB	57,6	16,3	0,254	(GARCÍA-TORREIR O et al., 2016a)
<i>Halomonas boliviensis</i>	Hidrolisado de cereal amiláceo	SSF, reator 2L	PHB	55,1	26	0,357	(GARCÍA-TORREIR O et al., 2016)
<i>Cupriavidus necator</i>	Hidrolisado de palha de arroz	Batelada, frascos de Erlenmeyer	PHB	21	0,36	0,03	(AHN et al., 2015)
<i>Bacillus megaterium</i>	Hidrolisado de palha de arroz	Batelada, frascos de Erlenmeyer	PHB	32,5	1,49	0,031	(LI et al., 2021)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrolisado de madeira de bordo	Batelada alimentada, reator 1L	PHB	51,4	8,72	0,091	(PAN et al., 2012)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Hidrolisado de palha de arroz	Batelada, frascos de Erlenmeyer	PHB	70,15	10,87	0,226	(SARATALE; OH, 2015)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Hidrolisado de palha de girassol	Batelada, frascos de Erlenmeyer	PHB	67,18	8,82	0,184	(SARATALE; OH, 2015)

FIM

A maioria dos processos aplicados para a produção de PHAs são realizados em estado submerso. Entretanto, alguns trabalhos da literatura relatam o uso de fermentação em estado sólido (FES) para a produção dos PHAs. Apesar de ser uma boa alternativa para o uso de materiais lignocelulósicos, a FES apresenta grandes desvantagens no controle de parâmetros durante a fermentação e na recuperação do produto ao final do processo (SINDHU et al., 2015). Dessa maneira, consolida-se a fermentação submersa para a produção industrial dos PHAs.

2.4.5. Métodos de recuperação de PHAs

Por se tratar de um produto intracelular, a recuperação de PHAs é um passo crítico do processo que também impacta diretamente no custo final do biopolímero (STRAATHOF, 2011). Além disso, o método escolhido para extração do biopolímero possui influência na pureza do produto final e, conseqüentemente, na sua aplicação futura. Os métodos mais comuns para extração dos polímeros são extração por solvente, digestão química e enzimática e ruptura mecânica. As técnicas de extração por solvente são as mais consolidadas e aplicadas na literatura. Nestas, as células ricas em PHAs são misturadas com solventes orgânicos – geralmente clorados, como clorofórmio, diclorometano, etano policlorado – nos quais os polímeros são solúveis (KOLLER et al., 2013). A recuperação do PHA se faz através da precipitação com um “anti-solvente” tais quais metanol, etanol, acetona, hexano e até mesmo água ou com a mudança na temperatura do sistema, na qual o PHA se torna insolúvel (KOLLER et al., 2013). Os polímeros obtidos por esses métodos de recuperação apresentam alta pureza. Entretanto, os solventes aplicados para tal extração são considerados tóxicos para o meio ambiente e seu uso contraria a sustentabilidade aclamada da produção dos PHAs (MADKOUR et al., 2013).

Já os métodos de digestão químicos podem aplicar diversos compostos para que os PHAs sejam extraídos. Um deles é o hipoclorito de sódio, capaz de lisar os componentes celulares dos microrganismos produtores dos biopolímeros, os quais não se dissolvem neste solvente e são facilmente recuperados por processos de filtração e centrifugação. Apesar de ser um método com facilidade operacional, o hipoclorito de sódio pode ser responsável pela digestão de parte dos PHAs, reduzindo assim a sua massa molecular e restringindo as aplicações dos polímeros

(TAN et al., 2014). Agentes ácidos e alcalinos também podem ser aplicados para a ruptura celular e liberação dos PHAs, porém apresentam a desvantagem de potencial degradação do polímero (MADKOUR et al., 2013). A digestão enzimática, por sua vez, é realizada com enzimas capazes de lisar os componentes celulares tais quais nucleases, lipases, proteases e lisozima. Tal método tem maior especificidade e opera em condições brandas de temperatura, gerando bons rendimentos de processo e polímeros com alta pureza. Entretanto, o custo elevado dos catalisadores pode desencorajar o uso desse método de recuperação (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; MADKOUR et al., 2013).

Os métodos de ruptura físicos, como a homogeneização com alta pressão, moinho de bolas e ultrasonicação são técnicas que não necessitam da utilização de solventes, o que pode ser uma vantagem, porém seu uso não é comum pela dificuldade de aplicar em escala industrial (KOLLER et al., 2013). Outros métodos como a fragilidade celular e a liberação espontânea dos grânulos de PHAs envolve a engenharia genética de organismos. Apesar de serem métodos desejáveis industrialmente, os sistemas desenvolvidos ainda não apresentam bons rendimentos em termos de acúmulo e recuperação (RAHMAN et al., 2013; GONZALEZ et al., 2021).

2.4.6. Aplicações industriais

As propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade do PHA estende o potencial de suas aplicações para as mais diversas áreas. Para embalagens, os biopolímeros se adequam às requisições necessárias em tais aplicações, que são apresentar boa proteção contra poeira, contaminação e desidratação, além de possuírem pureza para qualidade alimentícia retendo as propriedades dos alimentos pelo tempo necessário (KALIA et al., 2019). Na agricultura, os PHAs podem servir de sacos de cultivo, redes e *mulching* (cobertura do solo) para a regulação da qualidade do solo nos sistemas de plantio. Como algumas dessas aplicações são de uso rápido, o uso de plásticos convencionais gera uma grande quantidade de resíduos indesejados, o que não ocorre com o uso de PHAs devido à sua biodegradabilidade (ADELEYE et al., 2020; KALIA et al., 2019). Além disso, os PHAs podem ser aplicados para a liberação controlada de fertilizantes (ADELEYE et al., 2020).

Na área médica, a propriedade de biocompatibilidade dos PHAs se destaca, podendo ser aplicados de diversas maneiras, como estruturas de suporte para engenharia de tecidos, *stents*, suturas e implantes biodegradáveis (WINNACKER, 2019). É elucidado que os monômeros de PHB, o 3-hidroxi-butilato (3HB), podem ser convertidos em 3-hidroxi-butilato metil éster (HMBE) no corpo, o qual pode ser usado como droga contra a doença de Alzheimer (KALIA et al., 2021). Dessa maneira, sistemas que aplicam PHB no corpo podem ajudar a retardar essa doença. Uma das áreas de destaque recente dos PHAs é a farmacêutica, na qual os polímeros são aplicados em sistemas de liberação controlada dos mais diversos fármacos e podem, assim, substituir o silicone aplicado para as mesmas aplicações (KALIA et al., 2021). Esses sistemas de liberação controlada podem ser responsivos à temperatura, pH ou possuir um sítio de ligação específico (GUMEL et al., 2013). As aplicações médicas e farmacêuticas são mais custosas, por demandarem biopolímeros com alto nível de pureza, atendendo às legislações de aplicação das referidas áreas.

2.5. Levantamento de dados sobre patentes e inovação

A fim de reiterar a relevância do tema dos bioplásticos, mais especificamente dos PHAs, no contexto da inovação, uma busca de patentes foi realizada. O tópico de inovação é sempre muito discutido na área da biotecnologia. A definição de inovação consagrada por Joseph Schumpeter é: a criação de algo novo aliado da difusão e comercialização disso para a sociedade (LAZZAROTTI et al., 2011). Uma das formas de difusão de conhecimento e inovação é através do sistema patentário, o qual também garante o direito de proteção sobre o intelecto empreendido para o desenvolvimento da tecnologia. No Brasil, o órgão que regulamenta esse sistema é o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI), o qual é responsável pelo gerenciamento do sistema, relacionamento internacional em tratados e concessão dos documentos. A patente, então, pode ser considerada o resultado dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de uma instituição ou indivíduo, conferindo o direito de exploração monopolística da tecnologia, criando competitividade.

Existem diversas plataformas de busca para levantamento de documentos patentários, sendo elas gratuitas ou não, e com acesso a diversos escritórios de

patentes ou limitadas à zonas com línguas em comum. Para o presente estudo, foi escolhida a base de dados *Derwent Innovation Index* (DII) considerando que os resultados de busca fornecem documentos patentários de mais de 50 países, com títulos e resumos em inglês, que têm passado por um exaustivo processo editorial de classificação, redação de resumo e indexação. Essa base de dados apresenta como principais vantagens a compreensão de patentes da mesma família, o acesso à informações sobre citações e a possibilidade de exportação de dados, permitindo uma análise mais rápida e profunda em outros softwares (SANTOS et al., 2014).

Dessa maneira, a busca foi conduzida através da combinação de palavras chave em inglês relacionadas aos biopolímeros (polihidroxicarboxilatos, sinônimos e acrônimos) e aos processos (produção, biorrefinaria, manufatura, separação, aplicação e sinônimos) no título dos documentos. Seguiu-se os parâmetros de busca avançada, que utiliza operadores "booleanos", considerando o uso dos termos "e", "ou" e "não" e utilizando o símbolo "*" para truncagem quando necessário. Foi utilizado também o Código de Classificação Internacional (IPC) C12 (truncado) que refere-se aos documentos que possuem o foco em produtos bioquímicos ou microbianos. Esse modo de busca permite restringir os resultados e retirar quaisquer documentos considerados fora do espectro do trabalho. O intervalo de tempo para estas buscas foi estabelecido entre o início do ano 2000 até agosto de 2022. Um total de 291 documentos foi recuperado e, após a revisão e exclusão manual de alguns documentos que foram considerados como fora do objetivo de análise do presente estudo, foi obtida uma base de dados com 265 documentos dos quais foram extraídos dados de ano de publicação, país de origem, tipo do aplicante e classificação manual elaborada pela autora.

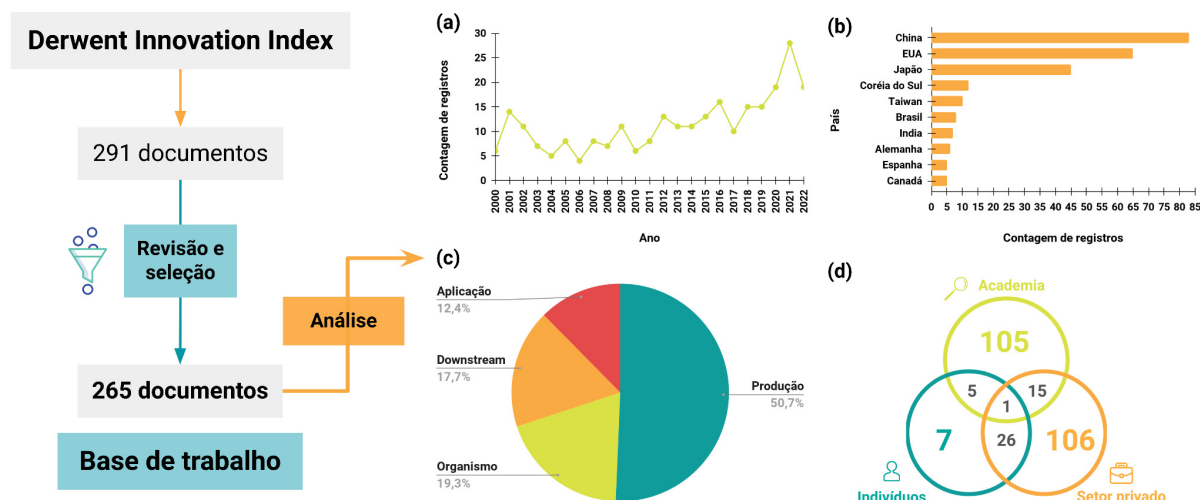
É possível observar que o número de documentos publicados durante os últimos 22 anos se mantém em uma crescente, com um expressivo aumento desde 2018 (FIGURA 2.6a). No início dos anos 2000, foi encontrado um pico do desenvolvimento da tecnologia, o que pode ser explicado pelo início da comercialização dos PHAs no mercado por diversas empresas. Entre elas destacam-se a americana Metabolix (fundada em 1992 e com operações encerradas em 2016), a Monsanto focada no desenvolvimento de plantas transgênicas e a japonesa Canon que possui cerca de 22 documentos publicados entre os anos de 2001 e 2003. Nos anos recentes, é possível relacionar a alta no

número de documentos publicados com a demanda crescente por processos e materiais sustentáveis, conforme discutido ao longo do trabalho.

O perfil de países de origem dos documentos revela o cenário global do desenvolvimento da tecnologia (FIGURA 2.6b). Os 4 maiores depositantes seguem o padrão de principais escritórios que detêm o maior número de documentos aplicados (WIPO, 2022), mas também são aqueles que possuem a origem de empresas produtoras de PHAs nos seus territórios. Destaca-se a Coreia do Sul, a qual possui a LG Chem®, empresa que anunciou recentemente o interesse no desenvolvimento de plásticos biodegradáveis (KOREA CERTIFICATION, 2020; BIOPLASTICS MAGAZINE, 2021). Destaca-se também o Brasil, que possui a empresa PHB Industrial em seu território e tem o desenvolvimento de novos processos de produção de PHAs em universidades federais, se encontrando em 6º lugar, demonstrando assim o potencial do mercado nacional para o desenvolvimento dos biopolímeros.

Percebe-se que o maior foco de desenvolvimento da tecnologia se encontra na produção dos biopolímeros (FIGURA 2.6c), além do interesse em novos organismos capazes de sintetizar PHAs. Isso pode demonstrar que o mercado de tais biopolímeros ainda está em expansão e não tão consolidado quanto de outros bioplásticos, como o poli-ácido láctico (PLA), o qual é mais difundido e com mais aplicações de produto já finalizado no mercado (VANDENBERGHE et al., 2021). Além disso, como já discutido, o custo de produção dos PHAs é mais elevado do que o custo de plásticos convencionais, o que pode levar a mais pesquisas que visem a redução de tal parâmetro na produção dos bioplásticos a fim de torná-los comerciais e competitivos. Constata-se um certo equilíbrio na quantidade de documentos depositados pela academia (universidades e instituições de pesquisa) e pelo setor privado (principalmente empresas) (FIGURA 2.6d). Este é um cenário positivo para o desenvolvimento sustentável, uma vez que os diversos setores da sociedade precisam estar envolvidos e comprometidos com a busca por novas tecnologias alternativas àquelas que vêm se tornando fardo ambiental. Além disso, esse equilíbrio demonstra uma fase propícia ao desenvolvimento de tecnologia, em que a oportunidade de cooperação entre os setores é maior, fazendo assim com que os processos desenvolvidos na academia sejam transferidos para o setor produtivo, colocando produtos finalizados no mercado.

FIGURA 2.6 -- ANÁLISE DOS DADOS DE DOCUMENTOS DE PATENTE OBTIDOS NA BUSCA REALIZADA NA BASE DII



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) ANO DE PUBLICAÇÃO (b) PAÍS DE ORIGEM (c) CLASSIFICAÇÃO e (d) TIPO DO DETENTOR

Destaca-se que, dos 265 documentos analisados, 42 tratavam especificamente de algum processo ou aplicação de PHB, 11 de seu copolímero polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV) e 4 de polihidroxibutirato-co-hexanoato (PHBHHx), demonstrando assim o interesse do desenvolvimento desse polímero em especial. Além disso, 4 registros de lci-PHAs foram relatados como no caso do documento EP1752532 que reivindica um microrganismo geneticamente modificado capaz de produzir PHAs (preferencialmente de cadeia longa) de maneira extracelular (SABIROVA et al., 2007). A TABELA 2.4 apresenta documentos considerados relevantes e que demonstram parte da tendência tecnológica de produção e aplicação dos PHAs.

TABELA 2.4 – EXEMPLOS DE DOCUMENTOS DE PATENTE REFERENTES À PRODUÇÃO E/OU APLICAÇÃO DE PHAs

Número da patente	País	Ano de publicação	Descrição da tecnologia	Referência
WO2007095707	Brasil	2007	Aplicação de PHB em um <i>blend</i> com outros polímeros na área de embalagens	(NASCIMENTO et al., 2007)
ID201301690	Indonésia	2013	Produção de PHB a partir de substrato amiláceo (derivado da tapioca) em modo de batelada alimentada	(MARGONO et al., 2013)
EP2818553	Irlanda	2014	Produção de PHAs a partir de cera obtida da pirólise de polietileno	(O'CONNOR et al., 2014)
ES2562377	Espanha	2016	Co-produção de PHAs e ectoína em modo SSF a partir de substrato amiláceo	(GARCIA TORREIRO et al., 2016b)
US10590426	EUA	2018	Produção de PHB e outros bioprodutos a partir de cianobactérias engenheiradas	(DUCAT et al., 2018)
BR102016015367	Brasil	2018	Produção de PHA com alta massa molecular a partir de glicerol	(ASSIS et al., 2018)
CN114480515	China	2022	Exemplo de modulação da composição de monômeros de PHA por substrato	(YIN et al., 2022)

3. OBTENÇÃO DE HIDROLISADO DA FRAÇÃO AMILÁCEA DO MILHO MOÍDO

3.1. Introdução

O milho é um produto agrícola originado da América Central e, atualmente, é cultivado em diversos países ao redor do mundo. Os Estados Unidos têm a maior produção anual - com cerca de 367,3 milhões de toneladas -, seguido pela China, com 271. O Brasil é o terceiro maior produtor dessa *commodity*, produzindo 126 milhões de toneladas por ano (INDEX MUNDI, 2022). O processamento do milho gera diversos subprodutos que não possuem alto valor nutricional e podem ser utilizados como substratos de processos fermentativos. Dentre os bioprodutos obtidos a partir do milho moído, encontram-se ácidos orgânicos como lático (MANANDHAR; SHAH, 2020) e cítrico (HU et al., 2014), proteínas e aminoácidos (BARNHARST et al., 2021), goma xantana (ROSALAM; ENGLAND, 2006) e biocombustíveis tais quais o bioetanol de primeira geração e biodiesel, em menor escala (CORN REFINERS ASSOCIATION, 2022; MOSER; VAGHUN, 2012).

Os Estados Unidos são o principal produtor mundial de etanol derivado de milho, com uma produção estimada de 17,7 bilhões de galões por ano o que representa um valor de indústria de 32 bilhões de dólares estimados em 2021 (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2022b). O bioetanol brasileiro é derivado principalmente da cana de açúcar (KARP et al., 2021), todavia, com a fundação da União Nacional de Etanol de Milho (UNEM) em 2017, a produção deste composto a partir de milho tem se expandido com a inauguração de diversas usinas principalmente no Centro-Oeste. A UNEM estimou a produção de 2,5 bilhões de litros de etanol de milho no período de 2020/2021, um aumento significativo quando comparado a anos anteriores (BARROS; WOODY, 2020). Dessa maneira, a utilização do milho e subprodutos de sua cadeia de processamento para a obtenção de diferentes bioprodutos é amplamente pesquisada e aplicada industrialmente, principalmente devido à composição do milho, rico em carboidratos. O milho contém cerca de 71 a 87% de amido, sendo seu principal componente, de 3 a 6% de lipídios, entre 6 e 12% de proteína e até 4% de cinzas (Tabela 3.1).

TABELA 3.1 – COMPOSIÇÃO DO MILHO

Componente (%)						
Amido	Lipídios	Proteína	NDF**	ADF***	Cinzas	Referência
71,4	4,21	9,1	-	-	-	(BELYEA et al., 2004)
77,4-87,2*	3,1-5,7	6-12	8,9-11,9	3,3-4,3	1,1-3,9	(DRURY et al., 2008)
71,6	4,7	9,4	-	-	-	(HASSAN et al., 2021)
-	4,1	9,8	10,8	3,3	1,5	(KLEINHANS et al, 2005)
76,8	4,7	8,2	6	1,8	1,2	(ODJO et al., 2018)
72	4	10	9	-	2	(OWENS, 2005)

*Carboidratos

**NDF: *Neutral Detergent Fiber*, quantidade de celulose, hemicelulose e lignina de um material

***ADF: *Acid Detergent Fiber*, quantidade de celulose e lignina de um material

Como é possível observar, o milho contém uma alta quantidade de carboidratos. Para a recuperação total dos açúcares contidos e posterior utilização em bioprocessos, é necessário hidrolisar sequencialmente cada fração do substrato, iniciando-se pelo amido. Para a hidrólise do amido do milho, enzimas amilolíticas podem ser empregadas. As amilases (EC 3.2.1.X) são classificadas como hidrolases glicosídicas, ou seja, clivam ligações entre os monômeros de um polissacarídeo. As α -amilases agem na estrutura interna do amido, clivando as ligações glicosídicas α -1,4, as quais formam oligossacarídeos de glicose. Por sua vez, a glucoamilase age nos terminais não redutores do amido e libera monômeros de glicose através da clivagem das ligações α -1,4 e α -1,6. Dessa maneira, trata-se a biomassa com as duas enzimas de forma sequencial para a liberação dos açúcares fermentescíveis (BIJTTEBIER et al, 2008).

3.2. Material e métodos

3.2.1. Recebimento e condicionamento do milho moído

O milho moído utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi fornecido pela empresa BTZ Tecnologia em parceria com a Usina Rio Verde. O material foi preparado de acordo com a norma NREL/TP-510-42620 (HAMES et al., 2008). Secou-se o material a 45°C por 48 horas e armazenou-se em recipientes hermeticamente fechados. Como o milho já estava devidamente moído, uma análise de tamanho de partículas para caracterização foi realizada conforme descrito na seção 3.2.2.

3.2.2. Caracterização do material

A umidade do milho moído foi determinada conforme a norma NREL/TP-510-42621 (SLUITER et al., 2008a). Um papel filtro qualitativo foi seco em estufa a 105°C por 4 horas e transferido para um dessecador até atingir a temperatura ambiente, a fim de se determinar seu peso em balança analítica. 1 g de substrato foi então depositado no papel filtro e o conjunto foi levado novamente à estufa a 105°C para secagem por 8 horas. Decorrido o tempo, as amostras foram transferidas para um dessecador até atingirem temperatura ambiente. A massa das amostras foi então registrada após pesagem em balança analítica e os sólidos totais e umidade foram calculados segundo as equações 3.1 e 3.2.

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{(Massa_{\text{papel} + \text{amostra}} - Massa_{\text{papel}})}{Massa_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{equação 3.1})$$

$$\% \text{ Umidade} = 100 - \frac{(Massa_{\text{papel} + \text{amostra}} - Massa_{\text{papel}})}{Massa_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{equação 3.2})$$

O teor de cinzas foi determinado segundo a norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER et al., 2008b). Cadinhos de porcelana devidamente identificados foram levados a uma mufla a 575°C por 4 horas para calcinação e, após o tempo determinado, foram transferidos para um dessecador até atingirem temperatura ambiente. A massa inicial dos cadinhos foi registrada mediante pesagem em

balança analítica. 1 g de substrato foi então depositado nos cadinhos, os quais foram levados novamente à mufla a 575°C por 6 horas até que a amostra adquirisse coloração branca-acinzentada. Decorrido o tempo, as amostras foram transferidas para um dessecador até atingir a temperatura ambiente e suas massas foram registradas em balança analítica. A porcentagem de cinzas foi calculada segundo a equação 3.3.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(Massa_{\text{cadinho} + \text{amostra}} - Massa_{\text{cadinho}})}{Massa_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{equação 3.3})$$

A análise da distribuição do tamanho das partículas foi realizada através de peneiramento em agitador de peneiras do tipo magnético Bertel série 0501. 30 g de substrato foram pesados em balança analítica e depositados em um conjunto de peneiras para separação de partículas com tamanhos de 0,84; 0,425; 0,35 e 0,177 mm, sequencialmente dispostas, da peneira com maior granulometria para a menor de cima para baixo. As amostras foram então peneiradas durante 20 minutos. Mediante separação das diferentes frações, a massa de cada uma delas foi quantificada sob pesagem em balança analítica. A distribuição de tamanho das partículas foi calculada pela equação 3.4.

$$\% \text{ Distribuição} = \frac{Massa_{\text{amostra peneirada obtida}}}{Massa_{\text{amostra inicial}}} \times 100 \quad (\text{equação 3.4})$$

A determinação de amido foi realizada após o tratamento do milho moído com excesso de enzima α -amilase. Para isso, o substrato foi previamente seco em estufa a 45°C por 12 horas para remoção de toda a umidade do material. Então, uma massa determinada de milho (12,5 g) foi pesada em balança analítica e transferida para um frasco do tipo Schott com 87,5 mL de solução tampão citrato-fosfato pH 5, a fim de completar um volume reacional de 100 mL. A enzima α -amilase foi então adicionada a uma taxa de 1% (1 g de enzima por 100 g de

substrato) e a reação seguiu-se por 2h a 85°C. Decorrido o tempo, a mistura foi filtrada utilizando-se de funil de Buchner e bomba à vácuo utilizando papel filtro qualitativo devidamente identificado e pesado (conforme procedimento descrito para determinação de umidade). Os sólidos retidos foram secos em papel filtro em estufa a 80°C por 12 horas. Após esse tempo, as amostras foram transferidas para um dessecador até que atingissem temperatura ambiente e suas massas foram registradas em balança analítica. A porcentagem de amido no material foi calculada segundo a equação 3.5.

$$\% \text{ Amido} = 100 - \frac{(Massa_{\text{papel} + \text{amostra sem amido}} - Massa_{\text{papel}})}{Massa_{\text{amostra inicial}}} \times 100 \quad (\text{equação 3.5})$$

O nitrogênio total das amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl descrito no manual Velp Scientifica-UDK 159 (VELP SCIENTIFICA, 2015). 0,3 g do substrato foram pesados em balança analítica e transferidos para um tubo de reação de 250 mL. 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) e 2 tabletes de catalisadores VCM foram então adicionados ao tubo e as amostras foram digeridas por 90 minutos a 420°C. Após resfriamento das amostras (até 50 - 60°C), as etapas de destilação e titulação foram realizadas no sistema automático UDK 159 Velp Scientifica do laboratório de Química Analítica Avançada do PPGEBB, UFPR. O valor de nitrogênio total foi calculado automaticamente pelo equipamento, enquanto o teor de proteínas foi calculado segundo a equação 3.6.

$$\text{Proteína (\%)} = \text{Nitrogênio (\%)} * 6,25 \quad (\text{equação 3.6})$$

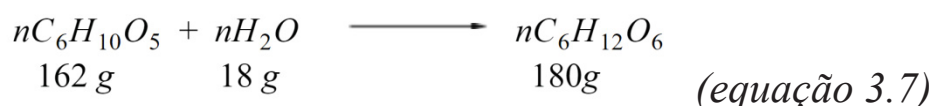
O conteúdo de metais traços (ferro, zinco, cobre e manganês) foi quantificado utilizando protocolo descrito pela Agilent Technologies (2021). O equipamento utilizado foi um espectrômetro de absorção atômica Agilent Technologies 240FS AA.

3.2.3. Hidrólise ácida do milho moído

A fim de comparar métodos de hidrólise da fração amilácea do substrato, um protocolo empregando tratamento com ácido diluído foi aplicado (WOICIECHOWSKI et al., 2002). Dessa maneira, adicionou-se em frascos do tipo Schott de 100 mL um volume reacional de 50 mL, 12,5% (m/v) de sólidos em uma solução de 1% de ácido. Foram testados os ácidos clorídrico, sulfúrico e cítrico. Essa mistura foi então aquecida em autoclave (121°C, 1 atm, 15 minutos) e, ao final do processo, hidróxido de sódio (NaOH) 4M foi aplicado para a neutralização do pH para 7.

3.2.4. Hidrólise enzimática do amido do milho moído

Os primeiros testes de hidrólise enzimática do milho moído seguiram o protocolo fornecido pela empresa parceira BTZ para o desenvolvimento da tecnologia. De acordo com o protocolo, o substrato foi misturado à água e o pH ajustado para a faixa ótima da enzima (5,3 - 5,7). A α -amilase empregada foi fornecida, sendo fracionada em tubos tipo Falcon de 50 mL e mantidas sob refrigeração (4°C) conforme recomendação. Esta foi adicionada a uma concentração de 0,2 kg de enzima por tonelada de substrato (equivalentes à 0,2 mg de enzima por grama de substrato) e a hidrólise ocorreu a 85°C por 2 horas em banho maria estático Solab SL 155. Decorrido este tempo, a mistura foi resfriada para a adição de glucoamilase a uma concentração de 0,35 kg de enzima por tonelada de substrato. Visto que o objetivo da empresa é a produção de bioetanol de forma simultânea à sacarificação, a reação foi realizada a 33°C por 48 horas sob agitação. A fim de avaliar um panorama geral da hidrólise, os testes iniciais com a enzima glucoamilase foram realizados a 60°C (temperatura ótima da enzima) e agitação de 100 rpm com um tempo de hidrólise de 2 horas em banho maria agitado Ethik Technology modelo 501-D. Os testes foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de volume reacional. O rendimento do processo de hidrólise em termos de gramas de açúcar liberados por grama de amido inicial foi calculado com base na equação de conversão do amido para glicose mediante hidrólise (Equação 3.7) (SCHWEINBERGER et al., 2019).



Assim, o rendimento teórico esperado é de 1,1 g glucose/g de amido.

3.2.5. Otimização da hidrólise enzimática do amido do milho moído

As etapas de otimização da hidrólise enzimática do amido do milho moído são apresentadas na Figura 3.1.

FIGURA 3.1 – ETAPAS SEGUIDAS PARA OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO AMILÁCEA DO MILHO MOÍDO

Etapa	Resposta avaliada	Condição estabelecida	
Avaliação da concentração de milho moído inicial	Liberção de açúcares (DNS) e rendimento (g açúcar/g amido)	12,5% (m/v)	
Teste de pré-gelatinização	Liberção de açúcares (DNS)	Pré-gelatinização descartada	} Aumento do custo de processo sem aumento significativo no rendimento
Hidrólise dos sólidos remanescentes	Liberção de açúcares (DNS)	Etapa descartada	
Avaliação da concentração das enzimas em conjunto	Liberção de açúcares (DNS) e rendimento (g açúcar/g amido)	Avaliar enzimas isoladamente visto a dependência de respostas	
Avaliação da concentração de α -amilase	Rendimento (massa obtida/massa esperada) ao final do processo de liquefação	Aumento da dose de α -amilase para 0,25 mg enzima/g sólidos	} As condições estabelecidas de concentração enzimática foram testadas em tanque agitado de IL posteriormente testando diferentes concentrações de sólidos (12,5 e 15% (m/v)) visto a maior homogeneização da reação nesse sistema
Avaliação da concentração de glucoamilase com e sem sólidos para sacarificação	Liberção de açúcares (DNS) e rendimento (g açúcar/g amido)	Com sólidos: 0,35 mg enzima/g sólidos Sem sólidos: 0,44 mg enzima/g sólidos	

Fonte: A autora (2022)

3.2.5.1. Avaliação de diferentes concentrações iniciais de sólidos e teste de pré-gelatinização do amido

Seguindo o protocolo descrito na seção 3.2.4, diferentes concentrações iniciais de sólidos do substrato - 10; 12,5; 15; 20 e 25% (m/v) - foram testadas em triplicata. De acordo com o melhor resultado obtido, a concentração de sólidos foi determinada e aplicada para os demais testes. A fim de avaliar a ação das enzimas nos sólidos, um teste de controle sem enzimas foi realizado. As respostas avaliadas foram a liberação de açúcares redutores ao final do processo e o rendimento calculado segundo a equação 3.7 (g açúcares/g amido). Segundo Woiciechowski et al. (2002), uma pré-gelatinização do amido do substrato é sugerida previamente à

hidrólise visto que as ligações intermoleculares do amido são enfraquecidas, possibilitando a liberação de açúcares. Dessa maneira, realizou-se um teste de pré-gelatinização em autoclave (121°C, 1 atm, 15 minutos) do milho moído em suspensão (12,5% (m/v)) em água destilada, em triplicata. Após esse processo, a hidrólise foi realizada conforme descrito na seção 3.2.4. O resultado avaliado para a pré-gelatinização foi a liberação de açúcares ao final do processo.

3.2.5.2. Avaliação da hidrólise dos sólidos remanescentes

Os sólidos remanescentes da hidrólise enzimática do amido de milho moído passaram por um novo tratamento enzimático visto que o substrato ainda apresentava amido residual, observado pela reação com iodo (DAHR, 2002). Diferentes concentrações dos sólidos remanescentes - 10; 12,5 e 15% (m/v) - foram submetidas ao processo descrito na seção 3.2.4 com o objetivo de avaliar a liberação de açúcares. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.5.3. Avaliação da variação da concentração das enzimas amilolíticas em conjunto

A fim de avaliar a ação conjunta das enzimas no substrato e a influência da variação de suas concentrações de forma simultânea, foram realizados testes onde aumentou-se a concentração de cada enzima em 25 e 50%. Além disso, foram realizados testes mantendo-se a concentração de uma enzima sem aumento, e aumentando a concentração da outra em 25%, conforme a TABELA 3.2. Os testes foram realizados em triplicata. As respostas avaliadas foram a liberação de açúcares redutores ao final do processo e o rendimento calculado segundo a equação 3.7 (g açúcares/g amido).

TABELA 3.2 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS NA LIQUEFAÇÃO E SACARIFICAÇÃO DO AMIDO DE MILHO

Ensaio	Aumento da concentração de α -amilase (%)	Aumento da concentração de glucoamilase (%)	Concentração α -amilase (mg/g)	Concentração glucoamilase (mg/g)
A	25	25	0,25	0,4375
B	50	50	0,3	0,525
C	0	25	0,2	0,4375
D	25	0	0,25	0,35
E	0	0	0,2	0,35

3.2.5.4. Avaliação da variação de concentração de α -amilase

Estabelecendo-se a concentração de sólidos, foram avaliadas diferentes doses das enzimas fornecidas. Para a α -amilase as doses testadas foram: 0,15; 0,2; 0,25 e 0,3 mg enzima/g substrato. O objetivo foi avaliar o rendimento de hidrólise de amido em termos de massa final obtida e esperada calculado pela equação 3.8. Os testes foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Massa}_{\text{amostra filtrada}}}{\text{Massa}_{\text{amostra inicial}} \times 0,75} \times 100 \quad (\text{equação 3.8})$$

Em que 0,75 é o fator de correção correspondente à quantidade de amido quantificado no milho moído (75%).

3.2.5.5. Avaliação da variação da concentração de glucoamilase

Com a concentração de sólidos iniciais e de α -amilase estabelecidas, foram avaliadas diferentes concentrações de glucoamilase na 2ª etapa de hidrólise do amido de milho (sacarificação) - 0,175; 0,2625; 0,35 e 0,4375 mg enzima/g de substrato. A fim de elucidar a performance da enzima nas condições citadas, a

fração de sólidos proveniente da hidrólise com α -amilase (liquefação) foi separada por filtração de forma a realizar os ensaios de hidrólise sem a presença destes. Os testes foram realizados em triplicata. Foram avaliadas a liberação de açúcares redutores ao final do processo e o rendimento calculado segundo a equação 3.7 (g açúcares/g amido).

3.2.6. Avaliação da viabilidade de processo de sacarificação e fermentação simultânea

A fim de avaliar a viabilidade de um processo de sacarificação e fermentação simultâneas para a produção de diferentes bioprodutos, o processo de hidrólise com α -amilase (liquefação) foi conduzida nas condições otimizadas. Na sequência o processo de hidrólise com glucoamilase (sacarificação) foi conduzido a 33°C, temperatura de fermentação para a produção de bioetanol, em um tempo de incubação de 72 horas, com amostragem a cada 12 h. Os estudos foram realizados com e sem a presença de sólidos, visto que o meio fermentativo para a produção de determinadas biomoléculas de interesse não pode conter sólidos, a fim de facilitar os processos de *downstream*. Nesse ensaio, nenhum microrganismo foi inoculado ao meio, e o teor de açúcares liberados pela ação das enzimas durante o período estipulado foi avaliado pelo método de DNS, a fim de compreender como seria o perfil de hidrólise simultânea à fermentação (SSF).

3.2.7. Hidrólise em tanque agitado de 1L

As condições otimizadas para a hidrólise enzimática do milho moído foram aplicadas em um tanque agitado de 1L do tipo banho maria TE-054 MAG, acoplado a um agitador mecânico TE-139 da marca Tecnal. As condições de operação para a etapa de liquefação foram: 85°C, pH 5,3 - 5,7, 100 rpm, concentração de α -amilase de 0,25 mg enzima/g substrato e 2 horas de processo. Para a etapa de sacarificação, as condições aplicadas foram: 60°C, pH 5,3 - 5,7, 100 rpm, concentração de glucoamilase de 0,35 mg enzima/g substrato e 2 horas de processo. A concentração estabelecida de sólidos (12,5% (m/v)) foi testada, além da concentração de 15% (m/v) para avaliação dessas diferentes condições em um

sistema de tanque agitado com maior homogeneização do meio. Ao final do processo, a liberação de açúcares redutores foi quantificada, e o rendimento calculado segundo a equação 3.7 (g açúcares/g amido).

3.2.8. Comparação de custos da hidrólise ácida e enzimática do amido de milho moído

A fim de comparar os custos envolvidos no processo de hidrólise enzimática e ácida do amido, um estudo econômico foi conduzido levando em conta a quantidade de energia necessária para cada processo, além do preço dos reagentes envolvidos. Como modelo, foi utilizado o trabalho desenvolvido por Woiciechowski et al. (2002) que comparou os custos de hidrólises enzimática e ácida do bagaço de mandioca.

No trabalho citado, os resultados experimentais em laboratório foram utilizados a fim de comparação do rendimento do processo, mas para a estimativa dos custos, uma escala piloto foi aplicada simulando um reator de aço inox de 1500 L (com diâmetro de 1 m, altura total 2,15m e altura útil 1,9 m). O processo da literatura e o presente processo foram conduzidos em condições semelhantes e, por isso, os valores de perda de calor para o ambiente nos processos de hidrólise foram considerados os mesmos, dado também que muitos dos parâmetros envolvidos nos cálculos dependem estritamente da geometria do biorreator aplicado (considerado o mesmo biorreator para esse estudo). Entretanto, o calor necessário para aquecimento foi calculado através da equação 3.9:

$$Q = m.c_p.\Delta T \quad (\text{equação 3.9})$$

Onde m é a massa aplicada (1500 kg, teóricos), c_p é o calor específico (3,97 considerando que o c_p do milho é 2,5 kJ/kg°C e o da água é 4,18 kJ/kg°C) e ΔT é a variação de temperatura.

3.2.9. Procedimentos analíticos

Os açúcares redutores liberados no hidrolisado foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959; DOS SANTOS et al., 2017). Assim, 100 µL de amostra diluída e 100 µL de reagente DNS foram colocados em placas de 96 poços do tipo *deep well* e mantidas a 96°C por 15 minutos. Posteriormente, elas permaneceram em banho de gelo por 5 minutos e adicionou-se 500 µL de água destilada. Por fim, 200 µL desse conteúdo foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, a qual passou por leitura de absorbância a 540 nm em leitor de microplacas Biotek® Powerwave XS. A concentração de açúcares foi determinada comparando os resultados obtidos com uma curva padrão de glicose previamente estabelecida.

Os açúcares redutores foram também analisados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência em um equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity do Laboratório de Química Analítica Aplicada do PPGEBB da UFPR. As amostras foram previamente diluídas e filtradas. As condições aplicadas no equipamento foram: coluna Hi-Plex 300 x 7,7 mm, fase móvel H₂SO₄ 0,005M, regime isocrático, vazão de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura da coluna de 60°C e T_{RI} de 50°C.

3.2.10. Análises estatísticas

Utilizou-se o software Statistica ® 5.0 para a análise de significância dos resultados. Os valores reportados em tabelas e figuras representam a média dos experimentos realizados em replicatas, conforme especificado em cada caso, e sendo apresentado-se o desvio padrão (±) para cada resultado. As barras de erros representam tal desvio (±).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Caracterização do material

A caracterização da matéria-prima é uma importante etapa no desenvolvimento de processo, visto que a estrutura de um determinado material

implica diretamente na escolha de diferentes estratégias para o seu processamento. Além disso, conhecer as características de um substrato permite a escolha adequada de sua maneira de acondicionamento ao longo do tempo com o objetivo de manter suas propriedades (AVRELLA et al., 2022).

Para materiais de origem biológica, como o milho moído, é necessário também levar em conta que características de cultivo, tais como condições do solo, temperatura, umidade e manejo da biomassa podem impactar na sua composição (PAES, 2006). A quantidade de amido (75,1%) contida no milho moído fornecido pela empresa parceira se aproxima dos dados apresentados na Tabela 3.1 referente a composição do material segundo diferentes autores, como Hassan et al. (2021) que reportou 71,6% desse carboidrato e Odjo et al. (2021), com 76,8%. Além disso, a quantidade de proteínas (8,5%) também se aproxima daquela obtida pelos mesmos autores (9,4 e 8,1%, respectivamente), demonstrando que o material possui as características necessárias para o desenvolvimento do processo. A quantidade dos demais componentes analisados são apresentados na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 – CARACTERIZAÇÃO DO MILHO MOÍDO

Componente	Porcentagem (%)
Amido	75,1
Umidade	12,5
Cinzas	0,004
Nitrogênio	1,36
Proteína	8,5
Fe, Mn, Cu, Zn (mg/Kg)	<100

Através da análise da distribuição de tamanho de partícula, foi possível observar que o material se encontrava, em sua maioria (56,13%) em uma granulometria de 0,425 a 0,84 mm, apresentando boa área superficial para ação dos catalisadores (TABELA 3.4). As diferentes frações foram testadas para a hidrólise do amido do milho moído, mas não foi observada diferença significativa nos resultados obtidos para tais frações (dados não apresentados). Dessa maneira, a

etapa de peneiramento não foi aplicada para os testes sequenciais da hidrólise. Além disso, é possível constatar visualmente que o substrato apresentava homogeneidade (FIGURA 3.2).

TABELA 3.4 – DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DO MILHO MOÍDO

Fração (mm)	Porcentagem (%)
> 0,84	8,64
0,425 - 0,84	56,13
0,35 - 0,425	16,39
0,177 - 0,35	12,81
< 0,177	6,01

FIGURA 3.2 – MILHO MOÍDO FORNECIDO PELA EMPRESA BTZ



Fonte: A autora (2022)

3.3.2. Hidrólise ácida do amido de milho moído

A hidrólise do milho moído com ácido clorídrico mostrou-se a mais vantajosa (78,17 g/L) quando comparada à hidrólise com os outros ácidos testados (TABELA 3.5), havendo também uma diferença visual entre os tratamentos – hidrolisado com ácido clorídrico com uma cor mais escura (FIGURA 3.3a). Isso pode ser devido ao fato de que o ácido clorídrico é considerado o mais forte de todos os testados. Pode-se observar ainda que a quantidade de açúcares liberados nas mesmas

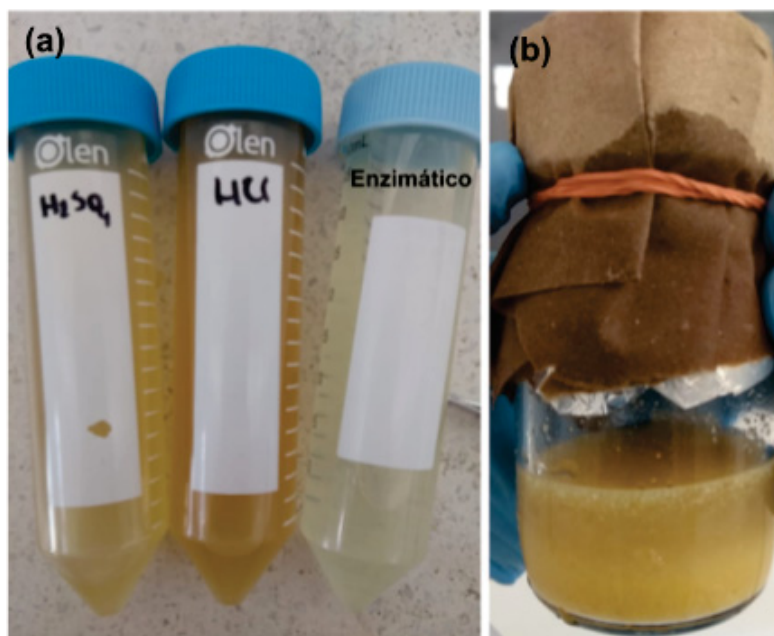
condições na hidrólise utilizando ácido cítrico (8,18 g/L) foi significativamente menor quando comparada à concentração de açúcares na hidrólise de ácido sulfúrico (45,73 g/L) ou clorídrico. O ácido cítrico pode ser considerado um *green solvent*, sendo aplicado como uma alternativa para pré-tratamento com ácido diluído de frações lignocelulósicas de diferentes biomassas (BITTENCOURT et al., 2022). Por ser um ácido orgânico, entretanto, apresenta características mais fracas quando comparado aos demais reagentes testados (HALL; ZUMDAHL, 2014).

Nos casos do ácido sulfúrico e clorídrico, houve uma clara separação entre as frações sólidas e líquidas, como pode ser observado na FIGURA 3.3b, indicando a solubilização do amido e sua hidrólise em mono e oligossacarídeos. No caso da hidrólise com ácido cítrico, foi observada a formação de uma massa sólida, uma vez que o amido não foi hidrolisado na mesma proporção quando comparado com os demais tratamentos. Além disso, ainda é possível que haja a liberação de outros açúcares diferentes da glicose – tais quais xilose e arabinose – no hidrolisado de maneira concomitante, uma vez que os ácidos são capazes de hidrolisar as ligações contidas na lignocelulose e solubilizar a fração de hemicelulose (DE VASCONCELOS et al., 2013), podendo explicar a razão dos hidrolisados serem mais escuros do que os hidrolisados enzimáticos. Outros compostos como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e vanilina, derivados da lignina, também podem estar presentes nesses hidrolisados, apresentando elevada toxicidade para manufatura de diferentes bioprodutos, pois são considerados inibidores do desenvolvimento microbiano (KUMAR; CHANDRA, 2020).

TABELA 3.5 – AÇÚCARES OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA DO MILHO MOÍDO

Ácido aplicado	Concentração de açúcares (g/L)	Rendimento obtido (%)
Clorídrico	78,168 ± 0,177	66,32
Sulfúrico	45,733 ± 0,118	38,80
Cítrico	8,180 ± 0,099	6,94

FIGURA 3.3 – HIDROLISADOS OBTIDOS APÓS PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO AMIDO DE MILHO MOÍDO



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) COMPARAÇÃO VISUAL DOS HIDROLISADOS OBTIDOS (b) ASPECTO DO HIDROLISADO AO FINAL DO PROCESSO ANTERIORMENTE À FILTRAÇÃO

3.3.3. Hidrólise enzimática do milho moído

3.3.3.1. Avaliação da influência de diferentes concentrações iniciais de milho moído e teste de pré-gelatinização do amido

A eficiência de um processo de hidrólise depende de diversos fatores: concentração do catalisador, tempo de reação e, principalmente, da concentração inicial de substrato. Naturalmente, com o aumento da quantidade inicial de substrato, há um aumento da liberação final do composto de interesse, uma vez que estas variáveis são diretamente proporcionais. Entretanto, existe um limite de saturação do catalisador em que a concentração de substrato se torna excessiva, fazendo com que todo catalisador esteja ligado ao substrato e que a velocidade de reação e liberação de produto permaneça constante (YAFUSO et al., 2014). Foi possível, então, observar um comportamento similar com o aumento da concentração inicial de milho moído para a hidrólise com enzimas amilolíticas.

Na TABELA 3.6 é possível observar que a maior concentração testada de milho moído levou à obtenção de maiores concentrações de açúcares redutores após as etapas de liquefação (α -amilase) e sacarificação (glucoamilase), chegando a 73,51 g/L, após um total de 4 horas de processo com um rendimento – em termos de gramas de açúcares liberados por grama de amido inicial – de 50,49%.

TABELA 3.6 – HIDRÓLISE DO MILHO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE SÓLIDOS

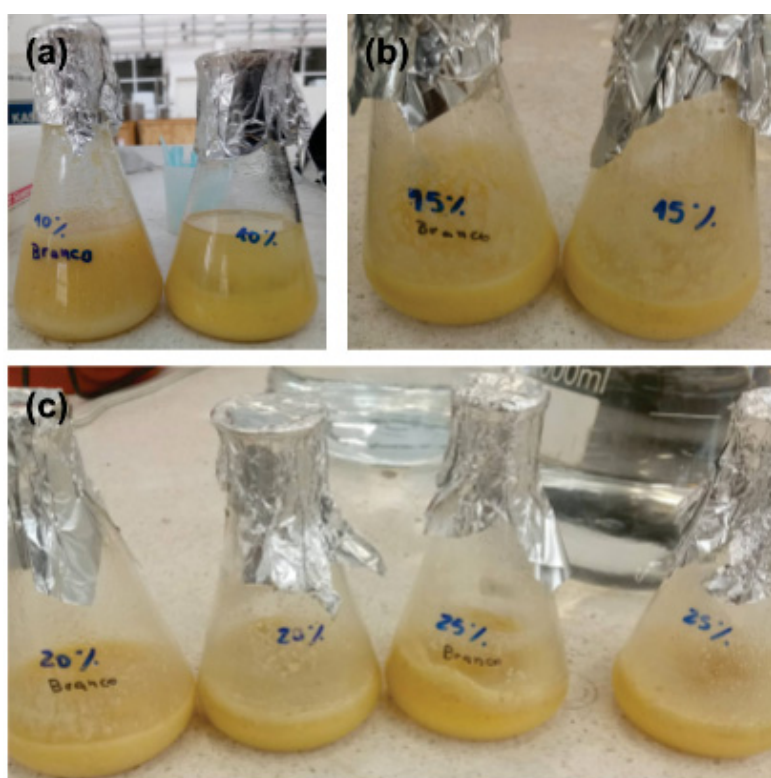
Concentração de sólidos (%)	Liquefação (α -amilase) Concentração de açúcares (g/L)	Sacarificação (glucoamilase) Concentração de açúcares (g/L)	Rendimento obtido (%)
10	35,202 \pm 1,642	48,974 \pm 4,164	53,43
12,5	38,249 \pm 2,301	64,807 \pm 3,838	54,99
15	53,816 \pm 2,532	73,512 \pm 2,722	50,49

Em concentrações mais baixas de substrato inicial (10 e 12,5%), houve uma separação clara entre a fração sólida e líquida ao final do processo de hidrólise, indicando que o amido foi solubilizado e reduzido às suas unidades formadoras (FIGURA 3.4a). Com 15% de sólidos, a separação entre as fases foi dificultada, embora o resultado de açúcares redutores ao final da hidrólise tenha sido maior (FIGURA 3.4b, TABELA 3.6). Em concentrações de 20 e 25%, não foi possível avaliar a liberação de açúcares, uma vez que a mistura ao final do processo apresentou-se sólida, comparando-se ao aspecto obtido com o experimento controle (branco) em que nenhuma enzima foi adicionada (FIGURA 3.4c). Dessa maneira, estabeleceu-se a concentração de 12,5% (m/v) de sólidos iniciais para as demais etapas de desenvolvimento do trabalho, uma vez que uma quantidade significativa de açúcares foi liberada (64,8 g/L), além da desejável separação entre as frações sólida e líquida ao final do processo, fato que facilita a posterior recuperação do hidrolisado por processos de filtração. Além disso, o rendimento obtido em termos de açúcares liberados, considerando a quantidade inicial de amido para os três testes realizados, foi similar, sendo passível de melhora através de novos testes da influência de diferentes concentrações da enzima.

Foi realizado um teste de pré-gelatinização do amido, onde o substrato (em concentração de 12,5% (m/v)) foi misturado à água e aquecido em autoclave a uma

temperatura de 121°C durante 15 min sem a presença de catalisador. Neste caso, o amido não foi degradado ou solubilizado, observando-se então a formação de uma massa sólida. Após a gelatinização, a hidrólise enzimática seguiu as mesmas condições descritas previamente, porém não se mostrou favorável, com uma quantidade de açúcares redutores menor do que a esperada (48,96 g/L), além de representar um custo extra de processo. Sendo assim, a etapa de pré-gelatinização do amido de milho moído não foi realizada nos testes subsequentes.

FIGURA 3.4 – EFEITO DA AÇÃO ENZIMÁTICA NO MILHO MOÍDO



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) 10% DE SÓLIDOS INICIAIS (b) 15% DE SÓLIDOS INICIAIS e (c) 20 E 25% DE SÓLIDOS INICIAIS

3.3.3.2. Avaliação da hidrólise dos sólidos remanescentes após hidrólise com amilases

Foi realizada uma avaliação dos sólidos remanescentes, após a hidrólise enzimática com amilases, utilizando a reação com iodo (DAHR, 2002) – onde estes adquiriram uma coloração azulada. Assim, foi possível determinar que tais sólidos ainda possuíam uma certa quantidade de amido residual. Dessa maneira, fez-se um

teste submetendo os sólidos remanescentes do primeiro processo de hidrólise enzimática a uma nova etapa de hidrólise, em diferentes concentrações iniciais de substrato, de modo a se recuperar o máximo possível do amido residual. Como tais sólidos passaram por uma etapa anterior de hidrólise, observou-se que a concentração de açúcares redutores ao final do período foi menor, com um máximo de 24,6 g/L atingido, considerando que a composição em amido era menor (TABELA 3.7). Ainda que açúcares redutores tenham sido recuperados, considerou-se mais vantajoso a otimização da concentração de enzimas para a obtenção de um maior rendimento, do que a realização de uma segunda etapa de hidrólise do amido, a qual representaria maiores custos operacionais e energéticos.

TABELA 3.7 – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS SÓLIDOS REMANESCENTES CONTENDO AMIDO RESIDUAL

Concentração de sólidos (%)	Liquefação (α -amilase) Concentração de açúcares (g/L)	Sacarificação (glucoamilase) Concentração de açúcares (g/L)
10	10,030 \pm 0,820	11,076 \pm 0,670
12,5	15,436 \pm 1,250	17,120 \pm 1,781
15	19,860 \pm 2,773	24,610 \pm 1,480

3.3.3.3. Avaliação do efeito da concentração de enzimas amilolíticas

Além da concentração inicial de substrato, a quantidade inicial de catalisador em uma hidrólise também impacta na liberação de produto. Diferentemente da concentração inicial de substrato, no qual o aumento expressivo pode levar à saturação enzimática, altas concentrações de catalisador no meio podem fazer com que tais compostos permaneçam em excesso durante e ao final da reação, o que não é desejável industrialmente devido ao seu elevado custo. Assim, é necessário encontrar um ponto de equilíbrio entre a concentração desejável de enzima com um rendimento satisfatório em termos de produto liberado. Para tal, foram realizados testes do aumento conjunto da concentração de forma simultânea ou individual das duas enzimas empregadas nas etapas de liquefação e sacarificação (TABELA 3.2).

Observa-se que com o aumento da concentração das duas enzimas em 25%, houve um aumento de quase 20% na liberação de açúcares redutores ao final da

hidrólise (TABELA 3.8). Nos demais tratamentos, o aumento não se mostrou tão expressivo, havendo até mesmo uma diminuição na concentração de açúcares no ensaio C, onde foi mantida constante a concentração de α -amilase, aumentando-se somente a concentração de glucoamilase em 25%. A hidrólise do amido a glicose é sequencial, onde as concentrações de cada enzima envolvidas são variáveis dependentes. Tal fato demonstra a importância da primeira etapa de liquefação no processo de hidrólise enzimática do amido, a qual promove a redução da viscosidade do meio pela hidrólise do amido em mono e oligossacarídeos, principalmente maltose, o que impacta na ação sequencial da amiloglicosidase. Dessa maneira, considerou-se mais adequado uma variação individual das doses enzimáticas, levando em conta respostas de rendimento em termos de amido hidrolisado (para α -amilase) e em termos de açúcares redutores liberados (glicose) ao final do processo (para glucoamilase).

TABELA 3.8 – HIDRÓLISE DE MILHO MOÍDO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ENZIMÁTICAS

Ensaio	Concentração α -amilase (mg/g)	Concentração glucoamilase (mg/g)	Concentração de açúcares (g/L)	Aumento relativo (%)	Rendimento obtido (%)
A	0,25	0,4375	79,965 \pm 6,916	17,72	67,85
B	0,3	0,525	68,784 \pm 0,736	1,26	58,36
C	0,2	0,4375	67,028 \pm 1,153	-1,32	56,87
D	0,25	0,35	71,710 \pm 0,266	5,57	60,84
E	0,2	0,35	67,927 + 2,825	-	57,64

3.3.3.4. Avaliação da variação da concentração de α -amilase

Devido à influência anteriormente observada da concentração utilizada de α -amilase na etapa de liquefação sobre a liberação de açúcares redutores ao final do processo de hidrólise do amido, decidiu-se testar novas concentrações da enzima isoladamente, avaliando somente o rendimento obtido em termos da massa

final obtida após a etapa de liquefação, demonstrando a porcentagem de amido recuperado. Os resultados mostram que a variação da concentração da α -amilase impactou diretamente no rendimento da reação (TABELA 3.9). Dessa maneira, pode-se fixar um aumento de 25% na quantidade de α -amilase (dose de 0,25 mg de enzima/g substrato), concentração na qual um rendimento de aproximadamente 80% foi obtido, o que é suficiente para o aumento da hidrólise do amido, não exercendo um efeito negativo na hidrólise com glucoamilase que hidrolisará a maltose em glicose

TABELA 3.9 – PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE DO AMIDO DE MILHO NA ETAPA DE LIQUEFAÇÃO COM α -AMILASE

Concentração de α -amilase (mg/g)	Rendimento obtido (%)
0,15	69,62 \pm 0,96
0,2	73,95 \pm 1,46
0,25	80,28 \pm 0,05
0,3	82,99 \pm 3,01

3.3.3.5. Avaliação da variação da concentração de glucoamilase

Após a definição da concentração de α -amilase para a liquefação na seção 3.3.3.4, diferentes concentrações de glucoamilase na etapa de sacarificação foram testadas. Visando avaliar o efeito da presença de sólidos sobre a atividade da glucoamilase, realizou-se a segunda etapa de hidrólise com e sem os sólidos remanescentes da primeira etapa de hidrólise, visto que a presença de tais sólidos pode afetar a ação da enzima.

Para a hidrólise com a presença de sólidos, houve um aumento positivo do rendimento (de até 65%), quando comparado ao resultado inicial obtido (rendimento de 54%, mencionado na seção 3.3.3.1). Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores da concentração de glucoamilase utilizada inicialmente e quando a concentração da enzima foi aumentada em 25%. Além disso, foi possível observar que a presença dos sólidos na etapa de hidrólise com glucoamilase teve uma influência negativa no processo, uma vez que o rendimento

obtido para esse processo foi menor quando comparado ao processo sem os sólidos no meio (TABELA 3.10) Além disso, houve diferença significativa no caso do aumento da concentração de glucoamilase em 25% para a hidrólise sem os sólidos no meio. Dessa maneira, fixou-se a concentração de glucoamilase para hidrólise na presença de sólidos em 0,35 mg enzima/g substrato (definida inicialmente), já que o aumento (0,44 mg enzima/g de substrato) não foi significativo, e para a hidrólise sem a presença de sólidos em 0,44 mg enzima/g substrato. Com estas condições houve uma liberação de açúcares de 76,68 g/L e 91,50 g/L, com e sem sólidos, respectivamente.

TABELA 3.10 – ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOAMILASE

Dose de glucoamilase (mg/g)	Hidrólise com sólidos		Hidrólise sem sólidos	
	Concentração de açúcares redutores (g/L)	Rendimento obtido (%)	Concentração de açúcares redutores (g/L)	Rendimento obtido (%)
0,175	62,869 ± 5,13	53,34	67,321 ± 2,10	57,12
0,2625	68,372 ± 6,70	58,01	67,759 ± 5,14	57,49
0,35	71,751 ± 7,01	60,08	76,175 ± 0,95	64,63
0,4375	76,685 ± 1,57	65,07	91,502 ± 3,74	77,64

3.3.4. Avaliação da viabilidade de processo de sacarificação e fermentação simultânea

A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) é um tipo de processo em que uma determinada enzima age no meio de maneira concomitante à produção de um determinado bioproduto, liberando os açúcares redutores de maneira constante para consumo pelo microrganismo. Esse método é amplamente aplicado na indústria de bioetanol de primeira geração (NIKOLIĆ et al., 2010), ou com o uso de amido derivado de subprodutos como a casca de batata (CHOHAN et al., 2020), utilizando a glucoamilase para liberação de glicose. A SSF foi aplicada para a produção de ácido láctico a partir de substratos amiláceos, tais como farelo de arroz (TANAKA et al., 2006) e de resíduos de alimentos de restaurante (PLEISSNER et al., 2017). A produção de polihidroxibutirato foi igualmente realizada a partir de

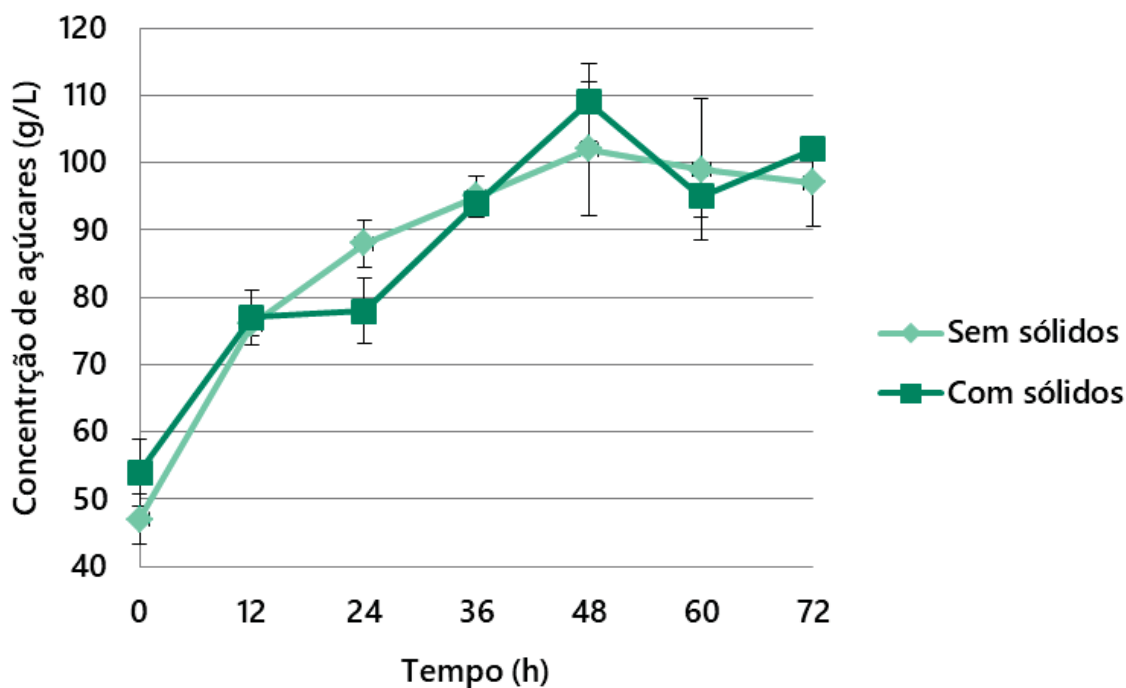
cereais (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016a). Neste último caso, a produção de biopolímero aumentou em 9,8% no modo de operação SSF quando comparado ao modo de batelada. A principal vantagem da SSF quando comparada à hidrólise convencional com glucoamilase é a redução de uma etapa de hidrólise e, conseqüentemente, da demanda energética e de custos operacionais, pois a temperatura de hidrólise deve ser a mesma da fermentação, a qual é normalmente mais baixa, a depender do microrganismo utilizado.

Portanto, a fim de avaliar a hidrólise enzimática em sua etapa de sacarificação, concomitantemente à fermentação, foi realizado um ensaio a 33°C (temperatura utilizada pela empresa parceira do projeto para produção de bioetanol), onde a liberação de açúcares ao longo do tempo pela ação da glucoamilase foi analisada. Neste ensaio, não foi inoculado nenhum microrganismo. Na Figura 3.5, pode-se observar que o teor de açúcares máximo foi atingido em 48 h de processo, sendo 102 g/L para o processo sem a presença de sólidos no meio e 108 g/L para o processo com a presença de sólidos, com rendimentos de 86 e 92%, respectivamente. Tal fato demonstra que a glucoamilase foi capaz de agir em temperaturas reduzidas, porém durante um período de tempo maior, conforme observado na FIGURA 3.5. Turini e colaboradores (2021) obtiveram um rendimento máximo de 87% da hidrólise enzimática do amido de arroz com 25 horas de reação (90 minutos para liquefação e 24 horas para sacarificação), que se compara ao resultado obtido na hidrólise enzimática sem sólidos (rendimento de 86%) (TURINI et al., 2021).

O processo de produção de bioetanol e de outras biomoléculas de interesse, poderia ser conduzido com sólidos no meio, se o produto for extracelular. Entretanto, para a produção de produtos intracelulares, em que o *downstream* visa a recuperação da massa celular contendo o bioproduto, o processo mais indicado seria a SSF sem a presença de sólidos remanescentes da liquefação.

Os açúcares iniciais liberados pela enzima α -amilase são constituídos principalmente de maltose, uma alternativa a ser avaliada seria inocular uma primeira dose da enzima glucoamilase e esperar um período de tempo para a liberação inicial de glicose no meio, para então a inoculação do microrganismo de interesse. Além disso, outras alimentações de enzima podem ser feitas ao longo do processo caso observe-se que a enzima perca sua funcionalidade durante o tempo escolhido.

FIGURA 3.5 – CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES PELA HIDRÓLISE COM GLUCOAMILASE (SACARIFICAÇÃO) À 33°C NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SÓLIDOS REMANESCENTES DA LIQUEFAÇÃO



Fonte: A autora (2022)

3.3.5. Hidrólise em tanque agitado de 1 L

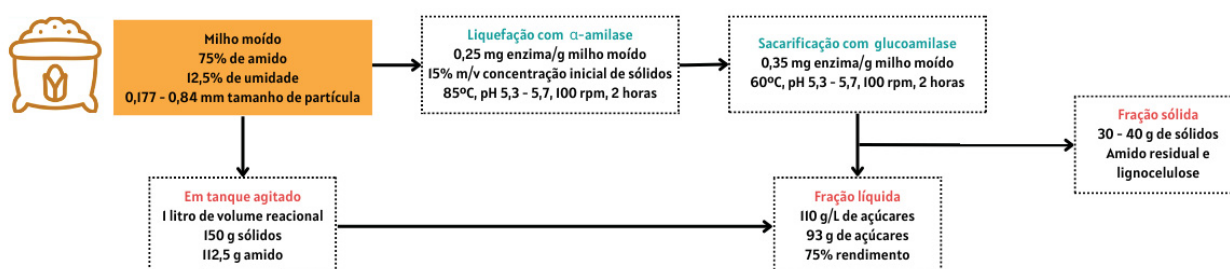
Com as condições de processo (concentração de sólidos, concentração das enzimas, tempo e temperatura) estabelecidas, foi possível realizar o processo de hidrólise do amido de milho moído em um tanque agitado de bancada, simulando um processo em escala piloto ou industrial. Prevendo-se uma melhor homogeneização do meio pela agitação mecânica, foram testadas as concentrações de sólidos de 12,5% (m/v) (definida previamente) e de 15% (m/v). O efeito visual da não liquefação completa do amido no caso da concentração de 15% (m/v) de sólidos observado em frascos de Erlenmeyer não foi observado no tanque agitado, permitindo assim um alto teor de açúcares final no hidrolisado, assim como um maior rendimento quando comparado aos demais processos descritos na escala menor (TABELA 3.11). No caso da concentração de 12,5% (m/v) para a hidrólise com sólidos, o rendimento máximo obtido nos testes em frascos de Erlenmeyer foi de 60% com 71 g/L de açúcares. Nas mesmas condições de concentração de

sólidos e enzimas, em tanque agitado foi obtido 64% e 75 g/L de açúcares, representando assim um aumento conforme a escala. Entretanto, destaca-se o resultado obtido com a concentração de 15% (m/v) de sólidos, teste em que 75% de rendimento foi obtido, com uma concentração de açúcares de 110 g/L, um aumento de cerca de 46% do resultado em termos de açúcares obtidos na melhor condição testada com sólidos em frascos de Erlenmeyer (71 g/L de açúcares) e de 20% para o teste sem sólidos (91 g/L). Dessa maneira, para os estudos de produção das biomoléculas de interesse, as condições estabelecidas para a obtenção do hidrolisado de fração amilácea foram: 15% (m/v) de sólidos, 0,25 mg enzima/g substrato para α -amilase, 0,35 mg enzima/g substrato para glucoamilase em sistema de tanque agitado. A FIGURA 3.6 apresenta um balanço de massa do processo otimizado em tanque agitado, considerando 15% (m/v) de sólidos iniciais. Os resultados obtidos se comparam de maneira positiva à outros estudos, como o estudo de Almeida e colaboradores (2019), em que o rendimento máximo reportado foi de 13% da hidrólise enzimática do amido de arroz vermelho (ALMEIDA et al., 2019). Por sua vez, Zainab e colaboradores (2011) obtiveram um rendimento de 65% da hidrólise enzimática de amido derivado de sorgo e de 78% para o amido de milho (ZAINAB et al., 2011).

TABELA 3.11 – HIDRÓLISE DO MILHO MOÍDO EM TANQUE AGITADO

Concentração de sólidos (% m/v)	Concentração de açúcares (g/L)	Rendimento obtido (%)
12,5	75,96	64,45
15	110,19	75,96

FIGURA 3.6 – BALANÇO DE MASSA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM TANQUE AGITADO COM 1 LITRO DE VOLUME REACIONAL



Fonte: A autora (2022)

3.3.6. Comparação de custos da hidrólise ácida e enzimática do amido de milho moído

A fim de comparar os métodos de hidrólise do amido por via ácida ou enzimática, foi conduzido um estudo de custos energéticos e de processo. Foi seguido o modelo descrito por Woiciechowski et al. (2002) com adaptações pertinentes ao processo desenvolvido para o milho moído. Considerando 1500 kg de substrato, e uma concentração de sólidos iniciais de 12,5% (m/v) e as condições do reator hipotético descritas na seção 3.2.5, a energia necessária para o processo foi calculada conforme descrito no trabalho de referência (TABELA 3.12)

TABELA 3.12 – COMPARAÇÃO DA ENERGIA NECESSÁRIA PARA CADA MÉTODO

Método	Variável	Valor calculado
Hidrólise ácida	Calor para aquecer de 25-121°C	572 MJ
	Perda de calor para o ambiente	550 J/s
	Tempo de hidrólise	15 minutos (900 segundos)
	Perda total	495 kJ
	Calor necessário	572 MJ
	Energia necessária	158,9 kWh
Hidrólise enzimática	Calor para aquecer de 25-85°C (α)	357,3 MJ
	Perda para o ambiente (α)	377 J/s
	Tempo hidrólise (α)	2h (7200 s)
	Perda total (α)	2714 kJ
	Perda para o ambiente (gluco)	203 J/s
	Tempo hidrólise (gluco)	2h (7200 s) OU 48h (172800s)
	Perda total (gluco)	1462 kJ OU 35 MJ
	Calor necessário	379 MJ OU 114,73 MJ
	Energia necessária	105,3 kWh OU 114,73 kWh

Percebe-se que a hidrólise enzimática apresenta uma demanda de energia menor (máximo de 114,73 kWh) quando comparada à hidrólise ácida (158,9 kWh). Isso é decorrente do fato de que a temperatura aplicada para a hidrólise enzimática (máximo de 85°C) é menor do que a temperatura aplicada para a ácida (121°C em sistema de autoclave), influenciando diretamente na quantidade de calor demandada. Os custos de reagentes necessários para ambos os processos, considerando a hidrólise de 1 tonelada de milho moído, estão descritos na TABELA 3.13.

TABELA 3.13 – PREÇO DOS REAGENTES USADOS PARA CADA PROCESSO DE HIDRÓLISE DE MILHO MOÍDO

Método	Reagente	Preço comercial*	Quantidade de reagente necessária (kg)	Preço do reagente (US\$)	Preço do processo de hidrólise (US\$)	Rendimento obtido (%)
Hidrólise ácida com HCl	HCl 37%	1 US\$/kg	216,21	216,21	1180,58	66,3
	NaOH	11 US\$/kg	87,67	964,37		
Hidrólise com H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄ 98%	32,80 US\$/L	81,63	1462,88	1822,25	38,8
	NaOH	11 US\$/kg	32,37	359,37		
Hidrólise enzimática	α-amilase	1000 US\$/kg	0,25	250,00	2203,60	64 - 92
	Glucamilase	4440 US\$/kg	0,44	1953,60		

*Dados de preço comercial retirados dos sites Pharma Compass, Chemical Book e Sigma Aldrich em 09/11/2021

Conforme o esperado, a hidrólise enzimática possui um custo de reagentes maior quando comparada à hidrólise ácida, devido ao alto custo das enzimas (que pode variar de 1000 a 4400 dólares por quilo). Entretanto, o rendimento em açúcares redutores é maior na hidrólise enzimática, podendo variar entre 64 – 92%, principalmente no caso da SSF, processo que não é passível de acontecer através da hidrólise ácida. Além disso, conforme citado, a reação com ácido pode contribuir para a liberação de açúcares derivados da hemicelulose, os quais nem sempre são facilmente metabolizados por microrganismos e outros compostos que podem inibir o crescimento microbiano (KUMAR; CHANDRA, 2020). Por outro lado, a hidrólise enzimática age de maneira específica no amido liberando principalmente glicose.

Um outro fator que pode ser considerado crítico para a escolha do método de hidrólise é o ambiental, visto que os resíduos gerados na hidrólise ácida necessitam de um tratamento mais extensivo (HAGHIGHI MOOD et al., 2013), quando comparados com os tratamentos necessários para os resíduos da hidrólise enzimática.

3.4. Conclusões

A hidrólise do milho para a recuperação dos açúcares dos carboidratos se mostrou extremamente positiva. A primeira etapa, com enzimas amilolíticas, rendeu concentrações de açúcares de cerca de 70 a 110 g/L em escala de bancada (representando um rendimento de até 77%). Além disso, a simulação da sacarificação e produção de bioprodutos simultânea também mostrou-se viável e promissora (chegando a 92% de rendimento), com a liberação dos açúcares ao longo do tempo. Durante a hidrólise do amido com ácido clorídrico, os açúcares recuperados chegaram a 76 g/L com um rendimento de 62%. Através do estudo econômico, foi possível perceber que a hidrólise ácida do amido é mais barata em termos de reagentes, mas os demais fatores de rendimento e custo energético devem ser levados em consideração para a escolha do método a ser aplicado (TABELA 3.14).

TABELA 3.14 – RENDIMENTOS OBTIDOS DA HIDRÓLISE DO AMIDO DO MILHO COM DIFERENTES MÉTODOS

Método aplicado	Concentração de açúcares redutores (g/L)	Rendimento (%)
Enzimática em batelada com sólidos	71,751	60,08
Enzimática em batelada sem sólidos	91,502	77,64
Enzimática em tanque agitado	110,190	75,96
Enzimática em SSF com sólidos	108,624	92,00
Enzimática em SSF sem sólidos	102,412	86,72
Ácida com HCl	76,361	66,32
Ácida com H ₂ SO ₄	45,733	38,80

4. PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE MILHO MOÍDO E GLICEROL RESIDUAL

4.1. Introdução

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são um grupo de biopolímeros que servem de reserva energética para microrganismos em condições de estresse ambiental. O polihidroxibutirato (PHB) é um biopolímero que pertence à família dos PHAs, sendo considerado um polímero de cadeia curta. É o PHA mais comumente produzido (PARVEEZ et al., 2012). Sua produção em larga escala é realizada por processos fermentativos a partir de bactérias do gênero *Azotobacter*, *Bacillus*, *Archaeobacteria*, *Methylobacteria*, *Pseudomonas* (RATHORE, 2014). As empresas Metabolix e Tephra (Estados Unidos), Tianjin GreenBio Materials e TianAn Biopolymer (China) e pela brasileira PHB Industrial (DIETRICH et al., 2017) são alguns dos maiores produtores de PHB.

A bactéria *Cupriavidus necator* é uma das cepas mais estudadas e utilizadas para a produção de PHAs, visto que ela já foi reportada por rendimentos de até 80% em termos de massa seca (RATHORE, 2014) e é capaz de utilizar como fontes de carbono: glicerol residual, melão hidrolisado, ácidos orgânicos, óleos vegetais, hidrolisados de biomassa, dentre outros (MOZUMDER et al, 2014; PRADELLA et al, 2012). O uso de substratos alternativos, tais quais produtos da agroindústria ricos em polissacarídeos, em processos fermentativos pode reduzir o custo de produção, tornando os bioplásticos competitivos e acessíveis.

O presente estudo visou a produção de PHB a partir de hidrolisados da fração amilácea do milho moído combinado com glicerol residual – substratos amplamente produzidos em território nacional – utilizando-se uma cepa comercial de *C. necator*. As condições de produção foram otimizadas, visando maximizar a produção de biomassa e acúmulo de PHB.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Microrganismo e reagentes

A cepa *Cupriavidus necator* LPB 1421, mantida no banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, foi utilizada ao longo do trabalho. Os cultivos foram obtidos a partir das células liofilizadas e armazenados a -80 °C em glicerol 20% (v/v). A manutenção das cepas foi realizada em tubos de ensaio com Ágar inclinado e placas de Petri em meio composto de 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona e 13 g/L de Ágar (GARCÍA et al., 2013). O glicerol residual (GR) foi fornecido pela empresa Ajinomoto do Brasil Ltda. O GR foi filtrado através de papel filtro qualitativo e sua densidade foi determinada utilizando-se um densímetro. Os parâmetros de pureza e composição elementar foram determinados antes de sua utilização no processo de produção de PHB, utilizando HPLC e cromatógrafo de íons.

4.2.2. Obtenção do hidrolisado da fração amilácea do milho moído

O hidrolisado utilizado no desenvolvimento das etapas de cultivo do microrganismo e produção de PHB foi obtido com as condições ótimas de concentração de enzimas e sólidos, em tanque agitado, descritas no Capítulo 3, seção 3.2.4.9. Assim, 15% (m/v) de milho moído foi submetido à hidrólise com α -amilase (0,25 mg enzima/g sólido) durante 2 horas a 85°C com 100 rpm de agitação e pH de 5,3 - 5,7 em sistema de tanque agitado de escala de bancada do tipo banho maria TE-054 MAG, acoplado a um agitador mecânico TE-139 da marca Tecnal. Decorrido o tempo da primeira etapa de hidrólise, o sistema foi resfriado para 60°C e a enzima glucoamilase (0,35 mg de enzima/g de sólidos) foi adicionada, sendo que a hidrólise foi realizada durante 2 horas nas mesmas condições de agitação e pH. Decorrido esse tempo, o hidrolisado foi recuperado mediante filtração a vácuo com sistema de Funil de Buchner. Os açúcares foram quantificados pelo método de DNS e a sua concentração foi ajustada de acordo com as condições de fermentação por diluição do hidrolisado, realizando o cálculo de proporcionalidade de soluções. Para testes de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), o hidrolisado aplicado foi obtido somente com a primeira etapa de hidrólise com a enzima α -amilase (liquefação), uma vez que a adição da enzima ocorreu simultaneamente à inoculação do microrganismo para a fermentação, conforme será descrito.

4.2.3. Preparo do meio de cultivo do inóculo e de produção de PHAs

4.2.3.1. Meio de inóculo

A preparação do meio do inóculo foi baseada no trabalho de García et al. (2013), sendo composto por: 20 g/L de fonte de carbono, 10 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona. O desenvolvimento do inóculo seguiu-se durante 24 horas a 30°C e 120 rpm em incubadora shaker refrigerada modelo SL223 Solab.

4.2.3.2. Meio de produção

O meio de cultura implementado para a produção do biopolímero descrito por Cavalheiro et al. (2009) foi composto de *Mineral Salt Medium* (MSM), tendo os seguintes elementos (g/L): fonte de carbono, 20; fonte de nitrogênio, 4; KH_2PO_4 , 13,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2; extrato de levedura, 1; ácido cítrico, 1,7. Além disso, foram adicionados, 10 mL/L de solução de elementos traços (TES), constituída por (g/L): FeSO_4 , 10; ZnSO_4 , 2,25; CuSO_4 , 1; CaCl_2 , 2; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,23; MnSO_4 , 0,5; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,1 e 10 mL/L de HCl (35%). Os componentes suscetíveis à precipitação nas condições de esterilização (fontes de nitrogênio, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e TES) foram esterilizados separadamente. Previamente à inoculação do meio, verificou-se o pH e, quando necessário, neutralizou-se com solução de KOH 4M. Os testes de fermentação foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio com taxa de inóculo de 10% (v/v) por 96 horas a 30°C e 150 rpm em incubadora shaker refrigerada modelo SL223 Solab. O extrato de levedura atua como fonte de nitrogênio suplementar do meio de cultivo, além de fonte de nutrientes. Diversos compostos foram testados para a fonte de carbono e nitrogênio, conforme especificado nas próximas seções.

4.2.4. Comparação de diferentes fontes de carbono para o desenvolvimento do inóculo

A fim de avaliar a utilização dos hidrolisados de milho obtidos e do glicerol residual como fonte de carbono para o desenvolvimento do inóculo de *C. necator*, foram realizados testes comparativos com reagentes analíticos, mantendo as

concentrações de extrato de levedura e peptona constantes e, portanto, as mesmas relações C:N. As fontes de carbono avaliadas foram: (i) glicose comercial; (ii) maltose comercial; (iii) combinação de glicose comercial e glicerol residual (proporção de 50:50); (iv) hidrolisado de milho moído; (v) combinação de hidrolisado e glicerol residual (50:50); (vi) glicerol residual e (vii) glicerol comercial. O teste foi conduzido em duplicata por 48 horas a 30°C e 120 rpm e amostras foram retiradas a cada 24 horas.

4.2.5. Avaliação da adição da milhocina como substituto do extrato de levedura para inóculo

A influência de diferentes fontes de nutrientes foi avaliada sobre o crescimento microbiano. Neste caso, a fonte de carbono (20 g/L) foi fixada, sendo utilizados o hidrolisado de milho moído (diluído para 10 g/L de açúcares) e o glicerol (10 g/L) na proporção de 50:50. As fontes de nitrogênio utilizadas foram igualmente testadas nas seguintes concentrações: (i) extrato de levedura a 10 g/L; (ii) milhocina a 5 g/L; (iii) milhocina a 10 g/L; (iv) milhocina a 15 g/L e; (v) milhocina a 20 g/L.

4.2.6. Estudo de diferentes condições para o crescimento de *Cupriavidus necator* no meio de produção

4.2.6.1. Efeito de diferentes fontes de carbono

A fim de avaliar o efeito do uso dos hidrolisados de milho obtidos e do glicerol residual como fonte de carbono para o desenvolvimento de *C. necator* no meio de produção de PHB, foram realizados testes comparativos com reagentes analíticos. As concentrações dos demais componentes do meio foram mantidas constantes, e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado como fonte de nitrogênio, conforme meio de referência (CAVALHEIRO et al., 2009). As fontes de carbono avaliadas foram: (i) glicose comercial; (ii) maltose comercial; (iii) combinação de glicose comercial e glicerol residual (proporção de 50:50); (iv) combinação de maltose comercial e glicerol residual (proporção de 50:50); (v) hidrolisado de milho moído; (vi) combinação de hidrolisado e glicerol residual (proporção de 50:50); (vii) glicerol residual e (viii)

glicerol comercial. O teste foi conduzido em duplicata por 96 horas a 30°C e 150 rpm.

4.2.6.2. Efeito da proporção de hidrolisado de milho moído e glicerol no crescimento de *Cupriavidus necator*

Diferentes proporções entre o hidrolisado do milho moído e glicerol residual foram testadas a fim de determinar a melhor condição para o desenvolvimento de *C. necator* no meio de produção de PHB. Foram mantidas as concentrações dos demais componentes do meio constantes e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi utilizado como fonte de nitrogênio, conforme meio de referência (CAVALHEIRO et al., 2009). As proporções estudadas entre hidrolisado de milho moído e glicerol residual foram: (i) 50:50; (ii) 60:40; (iii) 70:30; (iv) 80:20 e (v) 90:10. O teste foi conduzido em duplicata por 96 horas a 30°C e 150 rpm.

4.2.6.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio

A influência de diferentes fontes de nitrogênio foi avaliada sobre o crescimento de *C. necator* dentre as quais foram testadas: (i) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (ii) ureia. (iii) NH_4Cl e (iv) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. A fonte de carbono utilizada foi a combinação entre hidrolisado de milho moído e glicerol, em uma proporção de 70:30, e os demais componentes do meio foram mantidos em concentrações constantes. O teste foi conduzido em duplicata por 96 horas a 30°C e 150 rpm.

4.2.6.4. Efeito da fonte suplementar de nitrogênio e nutrientes

Diferentes concentrações de milhocina foram avaliadas em relação ao crescimento de *C. necator* no meio de produção de PHB: (i) 1; (ii) 2,5; (iii) 5 e (iv) 7,5 g/L. Neste caso, o extrato de levedura foi retirado do meio e os demais componentes do meio foram mantidos em concentrações constantes. A fonte de carbono utilizada foi a combinação entre hidrolisado de milho moído e glicerol, em uma proporção de 70:30 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi aplicado como fonte de nitrogênio. O teste foi conduzido em duplicata por 96 horas a 30°C e 150 rpm.

4.2.6.5. Influência de diferentes relações carbono:nitrogênio (C:N) sobre o acúmulo de PHB

Foram testadas diferentes relações C:N com o objetivo de avaliar o acúmulo de PHB por *C. necator*. Para tal, variou-se a concentração da fonte de carbono no meio, mantendo-se constantes os demais compostos. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e extrato de levedura foram utilizados como fonte de nitrogênio, sendo este último também como fonte de nutrientes suplementar. Foram testadas diferentes proporções C:N: (i) 9:1; (ii) 18:1; (iii) 27:1 e (iv) 36:1, o que corresponde a concentrações de 20, 40, 60 e 80 g/L de hidrolisado de milho moído e glicerol residual na proporção de 70:30. O teste foi conduzido em duplicata por 96 horas a 30°C e 150 rpm.

4.2.7. Primeira etapa de otimização da produção de PHB - Planejamento experimental Plackett-Burman para *screening* de variáveis significativas

Uma primeira etapa de otimização do processo de produção de PHB foi conduzida com o objetivo de realizar um *screening* inicial de variáveis significativas, utilizando-se um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB). Um total de 7 fatores foram testados: fonte de carbono (hidrolisado de milho moído e glicerol residual na proporção de 70:30), ureia (fonte de nitrogênio), extrato de levedura (fonte de nitrogênio suplementar e nutrientes), ácido cítrico, MgSO_4 , KH_2PO_4 e a solução de elementos traços. Utilizando-se do *software Statistica*® 5.0, foi definido o planejamento experimental composto por 12 experimentos (TABELA 4.1), contando assim com 4 graus de liberdade. Cada variável foi estudada em um nível mínimo (-1) e máximo (+1) e os valores para cada um desses níveis foi escolhido com base no meio de cultivo de referência (CAVALHEIRO et al., 2009) e de outros trabalhos de otimização de cultivo de *C. necator* (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; ARAMVASH et al., 2015) (TABELA 4.2). Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo por 96h a 30°C e 150 rpm, em duplicata.

TABELA 4.1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO PLACKETT-BURMAN DE 12 ENSAIOS E 7 FATORES

Ensaio	Fonte Carbono	Ureia	Extrato de Levedura	Ácido Cítrico	MgSO ₄	KH ₂ PO ₄	TES
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

TABELA 4.2 – VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NOS ENSAIOS DO PB

Fator	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Fonte Carbono (g/L)	10	70
Ureia (g/L)	1	5
Extrato de Levedura (g/L)	0	3
Ácido Cítrico (g/L)	0	3
MgSO ₄ (g/L)	1	5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	5	20
TES (mL/L)	5	15

4.2.8. Segunda etapa de otimização da produção de PHB - Planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional para otimização das condições do meio de produção

Após a seleção das variáveis significativas, foi realizada a segunda etapa de otimização da composição do meio de produção de PHB, utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com três variáveis, resultando em 16 experimentos (TABELA 4.3). Os ensaios foram conduzidos mantendo-se a concentração dos demais componentes do meio constantes e nas condições de cultivo previamente descritas. Os níveis foram escolhidos com base no meio de referência e na resposta obtida no PB. A fim de validar os modelos obtidos, as condições otimizadas do meio de produção foram testadas em triplicata.

As variáveis escolhidas para este planejamento experimental foram:

- Fonte de Carbono: hidrolisado e glicerol residual na proporção de 70:30
- Fonte de Nitrogênio: ureia e extrato de levedura na proporção 4:1
- Fonte de Fósforo: KH_2PO_4

TABELA 4.3 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR COM 16 ENSAIOS E 3 VARIÁVEIS

Ensaio	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	KH_2PO_4
1	20	2,5	5
2	20	2,5	10
3	20	7,5	5
4	20	7,5	10
5	60	2,5	5
6	60	2,5	10
7	60	7,5	5
8	60	7,5	10
9	6,4	5	15
10	73,6	5	15
11	40	0,8	15
12	40	9,2	15
13	40	5	1,6
14	40	5	18,4

15	40	5	15
16	40	5	15

4.2.9. Cinética da produção de PHB em frascos de Erlenmeyer

Após a otimização do meio de produção de PHB, foi realizada uma cinética em frascos Erlenmeyer de 250 mL, os quais continham 50 mL de meio fermentativo. Foi utilizada a condição ótima determinada anteriormente: 60 g/L de fonte de carbono (hidrolisado:glicerol na proporção 70:30), 2 g/L de ureia (fonte de nitrogênio), 0,5 g/L de extrato de levedura (fonte de nitrogênio suplementar e de nutrientes), 5 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de ácido cítrico, 1 g/L MgSO_4 e 10 mL/L de TES. A produção do PHB foi conduzida em batelada a 30°C, pH 6-7, 150 rpm por 96h, com amostragem a cada 12 horas em duplicata. O crescimento celular, o acúmulo de PHB e o consumo de substrato foram monitorados ao decorrer do tempo.

4.2.10. Cinética da produção de PHB em biorreator

A produção de PHB foi realizada em biorreator BioFlo 110 da marca New Brunswick Scientific de 10 litros de volume total. O biorreator contendo 8 litros de volume útil foi esterilizado em autoclave (121°C, 1 atm) por 20 minutos e inoculado em uma taxa de 10% após resfriamento. Uma taxa de aeração de 2 vvm foi estabelecida (CAVALHEIRO et al., 2009; FIORESE et al., 2009), com agitação de 400 rpm. Temperatura, agitação e oxigênio dissolvido (sensor Inpro 6000, Mettler Toledo) foram os parâmetros controlados por meio de sensores durante o processo. O crescimento celular, o acúmulo de PHB e o consumo de substrato foram monitorados por 96h com amostragem a cada 12 horas.

4.2.11. Testes preliminares de diferentes modos de operação para a produção de PHB

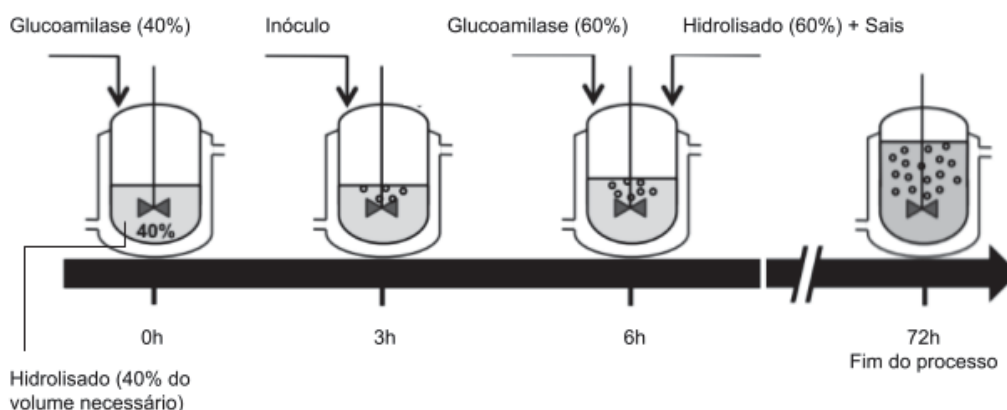
Foram testados diferentes modos de operação para a produção de PHB a fim de avaliar a viabilidade destes em pesquisa futura.

4.2.11.1. Sacarificação e fermentação simultâneas

O processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) para a produção de PHB foi realizado conforme descrito por García-Torreiro et al. (2016a) com alterações. Dessa maneira, o hidrolisado de milho, conforme já descrito (Seção 4.2.2) foi utilizado no meio de produção como única fonte de carbono (sem glicerol residual). As concentrações dos demais componentes foi mantida constante de acordo com o meio otimizado para a produção de PHB em batelada (2 g/L de ureia, 0,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de ácido cítrico, 1 g/L MgSO_4 e 10 mL/L de TES). A enzima glucoamilase foi adicionada na concentração de 0,44 mg de enzima por g de substrato inicial levando-se em conta o volume reacional do meio de fermentação (50 mL). Foram testadas duas taxas de inóculo: 5 (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016a) e 10% (utilizada no decorrer do trabalho). A fermentação foi conduzida a 30°C, pH 6-7, 150 rpm em duplicata. Quatro estratégias de alimentação da enzima, das soluções minerais (ureia, KH_2PO_4 , MgSO_4 e TES) e do inóculo foram testadas a fim de avaliar a influência desses elementos durante o processo:

- (a) Enzima adicionada no início do processo (0h); inóculo e sais adicionados depois de decorridas 12h;
- (b) Enzima e sais adicionados no início do processo (0h); inóculo adicionado depois de decorridas 12h;
- (c) Enzima, sais e inóculo adicionados no início do processo (0h);
- (d) Estratégia desenvolvida por García-Torreiro et al. (2016a), conforme FIGURA 4.1: 40% do hidrolisado necessário e 40% da dose da enzima adicionados no início do processo (0h); inóculo adicionado depois de decorridas 3h; sais, 60% do hidrolisado necessário e 60% da dose da enzima adicionados depois de decorridas mais 3h de processo (6h totais).

FIGURA 4.1 – ESTRATÉGIA D APLICADA PARA SSF



Fonte: Adaptado de GARCÍA-TORREIRO et al. (2016a)

4.2.11.2. Batelada alimentada

O teste da batelada alimentada foi realizado fazendo-se a alimentação de fonte de carbono e outros nutrientes no meio de cultivo em diferentes tempos de fermentação (24, 36 e 48h). O objetivo da alimentação da fonte de carbono, em diferentes momentos, foi restabelecer a concentração inicial de açúcares no meio (42 g/L). A alimentação foi realizada com o uso de uma solução de glicose comercial (concentração de 20 a 94 g/L, variando conforme necessário), com base nos resultados obtidos na cinética que foi conduzida em frascos de Erlenmeyer. Para as fontes de nutrientes (ureia e KH_2PO_4), considerou-se que 50% destes foram consumidos no tempo determinado de fermentação a fim de calcular o volume de alimentação. Dessa maneira, seis condições foram testadas:

- Alimentação em 24 horas, somente fonte de carbono
- Alimentação em 24 horas, fonte de carbono e nutrientes
- Alimentação em 36 horas, somente fonte de carbono
- Alimentação em 36 horas, fonte de carbono e nutrientes
- Alimentação em 48 horas, somente fonte de carbono
- Alimentação em 48 horas, fonte de carbono e nutrientes

Os testes foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL de volume inicial, utilizando o meio otimizado descrito previamente. O volume de alimentação foi estabelecido em 10 mL a fim de completar um volume final de fermentação de 50 mL. O cálculo do volume e concentração de alimentação foi

calculado pela relação de proporcionalidade (Equação 4.1) com alterações (Equação 4.2). O desenvolvimento da fórmula obtida se encontra no Apêndice 1. A fermentação foi conduzida a 30°C, pH 6-7, 150 rpm em duplicata.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (\text{equação 4.1})$$

$$V_{al} = \frac{(C-C_0)V_0}{C_{al}-C+C_0} \quad (\text{equação 4.2})$$

Onde V_{al} é o volume de alimentação, C_{al} é a concentração do composto na solução de alimentação, V_0 é o volume inicial, C_0 é a concentração inicial do composto e C é a concentração do composto no tempo determinado.

4.2.12. Testes preliminares de extração de PHB

Foram testados dois protocolos de extração de PHB com hipoclorito de sódio descritos por Heinrich et al. (2012) e Shin et al. (2021). De acordo com o primeiro protocolo, 20 g/L de células liofilizadas de *C. necator* foram ressuspensas em 50 mL de hipoclorito de sódio à 13% (v/v) em frascos do tipo Schott de 100 mL e incubadas por 1 hora a 30°C e 175 rpm. Em seguida, 25 mL de água destilada foram adicionados e as amostras foram novamente incubadas por 8 horas a 30°C e 175 rpm. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado para recuperação do pellet a 4000 rpm durante 15 minutos e lavado sequencialmente com água destilada, isopropanol 25% e novamente água destilada. Os sólidos recuperados foram liofilizados para secagem (HEINRICH et al., 2012).

De acordo com Shin et al. (2021), 50 mL do meio de cultivo foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos para a recuperação das células e estas foram então ressuspensas em 5 mL de hipoclorito de sódio à 13% (v/v). Após homogeneização em vortex, a solução foi transferida para frascos do tipo Schott de 25 mL e incubada por 1 hora a 30°C e 175 rpm. Posteriormente, o conteúdo foi

centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos e lavado sequencialmente com água destilada, etanol absoluto e novamente água destilada. Os sólidos recuperados foram liofilizados para secagem (SHIN et al., 2021).

O rendimento do processo foi calculado através da equação 4.3, enquanto a pureza foi determinada através da comparação entre a área do pico obtida no cromatograma do PHB padrão e do extraído depois de submetidos ao processo de metanólise e análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa, conforme a equação 4.4 (FEI et al., 2016).

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Massa PHB}_{\text{obtida}}}{\text{Massa PHB}_{\text{esperada}}} \times 100 \text{ (equação 4.3)}$$

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{Área pico PHB}_{\text{extraído}}}{\text{Área pico PHB}_{\text{padrão}}} \times 100 \text{ (equação 4.4)}$$

4.2.13. Elaboração de biofilme de PHB

Para a elaboração do filme de PHB, foi seguido o protocolo descrito por Gamal et al. (2013) com pequenas alterações. 250 mg do polímero extraído foram dissolvidos em 10 mL de clorofórmio P.A. e esta solução foi vertida em placas de Petri com 7 a 9 centímetros de diâmetro. O clorofórmio foi então completamente evaporado em temperatura ambiente em capela de exaustão para a formação do filme.

4.2.14. Métodos analíticos

A determinação da concentração de biomassa foi realizada através do método direto de peso seco. Tubos do tipo Eppendorf foram devidamente identificados e acondicionados em estufa de secagem de material a 80°C por pelo menos 12h. Em seguida, foram depositados em dessecador para atingirem a temperatura ambiente e sua massa foi registrada mediante a pesagem em balança

analítica. 2 mL do meio fermentado foram transferidos para cada tubo e o material foi então centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos para a recuperação do pellet. O sobrenadante foi armazenado para análises em HPLC. O pellet foi lavado com água deionizada para eliminação de interferentes do meio de cultivo e, após nova centrifugação nas mesmas condições, os tubos foram novamente acondicionados em estufa de secagem de material a 80°C por pelo menos 12 horas.

Os açúcares redutores liberados no hidrolisado foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959; DOS SANTOS et al., 2017). Assim, 100 µL de amostra diluída e 100 µL de reagente DNS foram colocados em placas de 96 poços do tipo *deepwell* e mantidas a 96°C por 15 minutos. Posteriormente, elas foram deixadas em banho de gelo por 5 minutos e adicionou-se 500 µL de água destilada. Por fim, 200 µL desse conteúdo foi transferido para uma microplaca de 96 poços, a qual passou por leitura de absorbância a 540 nm em leitor de microplacas Biotek® Powerwave XS. A concentração de açúcares foi determinada comparando-se os resultados obtidos com uma curva padrão de glicose previamente estabelecida.

Os compostos presentes nas amostras de hidrolisado e sobrenadante da fermentação (glicose, maltose e glicerol) foram também analisados e quantificados no equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity do laboratório de Química Analítica Aplicada do PPGEBB da UFPR. As condições utilizadas foram: coluna Hi-Plex 300 x 7,7 mm, fase móvel H₂SO₄ 0,005M, regime isocrático, vazão de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura da coluna de 60°C e T_{RI} de 50°C.

A análise do acúmulo de PHA intracelular foi realizada através do processo de metanólise ácida, permitindo a detecção do biopolímero por cromatografia gasosa (CG). Esse processo consiste na transesterificação do PHA gerando o seu éster metílico correspondente, o qual pode ser analisado por CG (VENTURA et al., 2022). O protocolo de Cavalheiro et al. (2009), foi seguido.

Para a preparação das amostras, a totalidade do meio de fermentação dos frascos de Erlenmeyer (50 mL, desconsiderando amostras retiradas para determinação de peso seco) foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O pellet foi recuperado e lavado com água deionizada para eliminação de quaisquer interferentes e, após uma nova centrifugação, as células recuperadas foram liofilizadas. 10 mg dessas células foram pesados em balança analítica em tubos de vidro de borossilicato devidamente identificados. Em seguida, 2 mL de metanol ácido

com 3% (v/v) de H_2SO_4 e 2 mL de clorofórmio foram adicionados aos tubos e agitados em vórtex por 30 s. Os tubos foram mantidos a 100°C em termoreator por 140 min e, a cada 30 min, os tubos foram agitados em vortex para garantir a homogeneidade da reação. Posteriormente, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente por 5 min e em banho de gelo por mais 10 min. Então, 1 mL de Na_2CO_3 (60g/L) foi adicionado em cada tubo e, decorridos 10 minutos, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min. Por fim, a camada superior (aquosa) foi removida com pipeta Pasteur e a camada inferior (orgânica) foi filtrada e transferida para vials.

A fase orgânica foi analisada em GC-2010 – Shimadzu, utilizando hidrogênio como gás de arraste e ácido benzóico como padrão interno. Amostras de PHB padrão (Sigma-Aldrich) em diferentes concentrações foram preparadas seguindo o mesmo protocolo a fim de comparação do tempo de retenção e construção de curva de calibração do equipamento.

4.2.15. Análises estatísticas

Utilizou-se o *software Statistica*® 5.0 para a análise dos resultados dos planejamentos experimentais, além das análises de significância. Os valores reportados em tabelas e figuras representam a média dos experimentos realizados em replicatas, conforme especificado em cada caso, sendo apresentado o desvio padrão (\pm) para cada resultado. As barras de erros representam tal desvio (\pm).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Caracterização do glicerol residual

Quanto ao glicerol residual, encontrou-se que a densidade é de 1,12 g/mL, a pureza corresponde a $39\pm 1\%$, destacando-se o conteúdo dos íons Cl^- (aproximadamente 12 g/L) e Na^+ (cerca de 10 g/L). Estes elementos podem estar presentes em altas concentrações, pois são utilizados como catalisadores em processos de produção e *downstream* onde o glicerol é gerado como resíduo (GANESAN et al., 2021). Levando-se em conta estes parâmetros, foi possível a posterior formulação dos meios de cultura para os processos fermentativos.

4.3.2. Crescimento do inóculo em diferentes condições

4.3.2.1. Efeito de diferentes fontes de carbono

O desenvolvimento de inóculo é a primeira etapa de um processo fermentativo, sendo essencial para a sua futura propagação em um meio fermentativo com objetivo da produção de uma biomolécula, além de servir como uma etapa de adaptação do microrganismo (SOOD et al., 2011). Dessa maneira, alguns testes foram conduzidos a fim de determinar a melhor condição para o cultivo do inóculo, tendo como resposta principal o peso seco obtido. Inicialmente, foi avaliado o uso de hidrolisado da fração amilácea do milho moído, glicerol residual e comercial, glicose e maltose como fontes de carbono (TABELA 4.4).

Como é possível observar, em 24 horas de cultivo do inóculo, não houve uma grande diferença no crescimento do microrganismo usando as diferentes fontes de carbono estudadas. Destacam-se os resultados da utilização combinada de hidrolisado de milho moído e glicerol residual – condição que apresentou o maior crescimento (6,58 g/L), indicando que o microrganismo pode ser cultivado com esses compostos –, e da maltose como fonte de carbono, com o menor resultado do conjunto estudado (3,97 g/L). Tal fato demonstra que a maltose é mais difícil de ser metabolizada pela bactéria, mas ainda permite o crescimento microbiano, conforme demonstrado em outros estudos (GOUDA et al., 2001). Quando utilizado de maneira isolada, o glicerol residual apresentou menor resultado ao ser comparado com o comercial, o que era esperado visto que o glicerol residual pode conter compostos tóxicos que podem inibir o desenvolvimento do microrganismo. Entretanto, seu uso combinado com outras fontes de carbono (glicose ou hidrolisado) permitiu um bom crescimento.

Com exceção da maltose, o desenvolvimento em 48 horas foi significativamente maior do que em 24 horas. Nesse tempo, os melhores resultados foram obtidos tendo glicose (11,3 g/L) e hidrolisado de milho moído (10,08 g/L) como fonte de carbono. Em ambos os casos nos quais o glicerol residual foi aplicado em conjunto das demais fontes de carbono, um crescimento menor foi observado (9,82 e 9,35 g/L para combinação com glicose e hidrolisado, respectivamente). Esses resultados demonstram a preferência metabólica do

microrganismo pela glicose quando comparada ao glicerol, principalmente com tempos maiores de desenvolvimento em 48 horas de cultivo. Contudo, o aumento de 24 horas no desenvolvimento do inóculo implica em um maior custo de produção – principalmente em termos de energia – da biomolécula de interesse e não causaria grande diferença no posterior cultivo do microrganismo no meio de fermentação. Além disso, é possível elucidar que o *C. necator* se encontra na fase exponencial de crescimento em 24 horas – ideal para a transferência para o meio fermentativo –, enquanto que em 48 horas, a fase estacionária pode ser atingida.

Dessa maneira, a fim de adaptar o microrganismo às fontes de carbono que serão posteriormente utilizadas, além de utilizar-se do resultado que demonstrou o maior crescimento dentro do conjunto estudado (6,58 g/L) em 24 horas, a combinação entre hidrolisado de milho moído e glicerol (na proporção de 50:50) foi escolhida para o desenvolvimento do inóculo visto que pretende-se minimizar custos relacionados ao meio de cultivo.

TABELA 4.4 – CRESCIMENTO DO INÓCULO COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO EM 24 E 48 HORAS

Fonte de Carbono	Biomassa (g/L) em 24 horas	Biomassa (g/L) em 48 horas
Glicose	5,73 ± 0,74	11,30 ± 1,20
Glicose e glicerol residual (50:50)	5,60 ± 0,00	9,82 ± 0,11
Hidrolisado	5,68 ± 0,74	10,08 ± 1,31
Hidrolisado e glicerol residual (50:50)	6,58 ± 0,11	9,35 ± 0,00
Glicerol comercial	5,23 ± 0,39	7,02 ± 0,25
Glicerol residual	4,47 ± 0,26	6,72 ± 0,11
Maltose	3,97 ± 0,04	3,15 ± 0,00

4.3.2.2. Avaliação do potencial de substituição do extrato de levedura por milhocina

A milhocina é um subproduto do processamento do milho rico em aminoácidos e vitaminas, e pode servir de substituto do extrato de levedura como

fonte de nutrientes e nitrogênio em cultivos microbianos. Entretanto, esse composto quando em altas concentrações, pode ser inibitório, visto que é um material que contém sulfitos e pode ser considerado um tipo de água residual ácida do processamento do milho. Além disso, sua composição pode variar significativamente de acordo com a safra, a partir da qual ele foi obtido, o que pode ser um problema na padronização do processo fermentativo (ZHOU et al., 2022).

Assim, foram estudadas diferentes concentrações de milhocina para avaliar a possibilidade de substituição do extrato de levedura, o qual é usado em uma concentração de 10 g/L no meio de cultivo (TABELA 4.5). Tais testes demonstraram o efeito de inibição do crescimento microbiano quando a milhocina era utilizada em concentrações acima de 10 g/L, conforme já reportado em outros trabalhos (KIBEOM et al., 2013; ABDUS-SALAAM et al., 2013). No caso da menor concentração estudada (5 g/L), o microrganismo foi capaz de se desenvolver (5,60 g/L), porém ainda em uma taxa menor do que quando o extrato de levedura (6,58 g/L) foi utilizado. Em 48 horas, observa-se que o resultado obtido com milhocina a 5 g/L (8,55 g/L de biomassa) se aproxima àquele obtido com extrato de levedura (9,35 g/L). Apesar de serem resultados próximos, seria necessário um aumento no tempo de inóculo em 24 horas para obter tal biomassa, o que não é ideal para um processo fermentativo industrial. Dessa maneira, manteve-se o extrato de levedura como fonte de nitrogênio e nutrientes para desenvolvimento do inóculo com 24 horas de desenvolvimento.

TABELA 4.5 – CRESCIMENTO DO INÓCULO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MILHOCINA EM 24 E 48 HORAS

Fonte de Nutrientes	Biomassa (g/L) em 24 horas	Biomassa (g/L) em 48 horas
Milhocina 5 g/L	5,60 ± 0,64	8,55 ± 0,14
Milhocina 10 g/L	0,85 ± 0,42	0,90 ± 0,49
Milhocina 15 g/L	1,23 ± 0,11	1,23 ± 0,25
Milhocina 20 g/L	1,25 ± 0,14	1,53 ± 0,25
Extrato de levedura 10 g/L	6,58 ± 0,11	9,35 ± 0,00

4.3.3. Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento do microrganismo no meio de fermentação

A fim de estudar a influência de diferentes fontes de carbono e a definição da composição do meio de fermentação para o desenvolvimento do trabalho, estudos comparativos com o uso de hidrolisado de milho moído, glicerol residual e fontes de carbono comerciais foram realizados. Assim, glicose, glicerol e maltose comercial foram utilizados como controles. Além disso, neste teste, o glicerol residual foi combinado com os açúcares comerciais a fim de elucidar o efeito deste composto no meio fermentativo.

Em todos os casos em que o glicerol residual foi aplicado em combinação com uma fonte de carbono, o crescimento foi maior quando comparado ao uso do açúcar isoladamente (TABELA 4.6). O melhor resultado obtido foi com a combinação entre hidrolisado de milho moído e glicerol em uma proporção de 50:50 (7,50 g/L), seguido de hidrolisado de milho moído utilizado de forma isolada (7,15 g/L). Nesse sentido, o glicerol residual pode estar desempenhando um papel de fonte “extra” de carbono que não é metabolizado tão rapidamente quanto os açúcares, mantendo a relação entre carbono e nitrogênio durante o decorrer da fermentação e, dessa maneira, induzindo um maior acúmulo de PHB, o que impacta diretamente no peso seco. O resultado obtido com glicose comercial (5,45 g/L) se aproximou de resultados obtidos em outros trabalhos da literatura, como por Aramvash e colaboradores com 5,14 g/L (ARAMVASH et al., 2015). Além disso, os resultados obtidos com glicerol comercial (4,92 g/L) e residual (4,60 g/L) não apresentaram diferença significativa entre si, demonstrando que os compostos presentes no glicerol residual não possuem um efeito inibitório no desenvolvimento microbiano na concentração presente. Os menores resultados obtidos no teste foram quando a maltose foi utilizada como fonte de carbono (3,75 g/L), o que condiz com os resultados do desenvolvimento do inóculo (Seção 4.3.2.1). Assim, a fonte de carbono selecionada para futuros testes foi a combinação de hidrolisado de milho e glicerol residual.

TABELA 4.6 – CRESCIMENTO DE *C. necator* EM MEIO MSM COM DIFERENTES FONTES DE CARBONO TENDO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ COMO FONTE DE NITROGÊNIO

Fonte de Carbono	Biomassa (g/L)
Glicose	5,45 ± 0,42
Glicose e glicerol residual (50:50)	6,73 ± 0,11
Maltose	3,75 ± 0,49
Maltose e glicerol residual (50:50)	4,38 ± 0,18
Hidrolisado de milho moído	7,15 ± 0,71
Hidrolisado de milho moído e glicerol residual (50:50)	7,50 ± 0,42
Glicerol comercial	4,60 ± 0,14
Glicerol residual	4,92 ± 0,67

4.3.4. Efeito de diferentes proporções entre hidrolisado de milho moído e glicerol no crescimento do microrganismo

Conforme já citado e discutido, o glicerol residual pode atuar como uma fonte de carbono extra no meio de cultivo visto que o microrganismo possui preferência metabólica por açúcares simples, gerando o estresse celular necessário para o devido acúmulo de PHB. Dessa maneira, visou-se estudar diferentes proporções entre o hidrolisado da fração amilácea do milho moído e o glicerol a fim de determinar uma melhor condição de cultivo. É possível observar que os resultados não apresentaram diferença significativa entre si em termos do peso seco obtido para as diferentes condições (TABELA 4.7). A maior produção de biomassa foi alcançada com a utilização de uma proporção 80:20 entre hidrolisado de milho moído e glicerol, com 7,95 g/L de biomassa após 24 horas. Já a proporção 90:10 é o resultado que mais diferiu do conjunto, com 6,80 g/L de peso seco ao final da fermentação, conforme observado na TABELA 4.7.

Em outros estudos desenvolvidos dentro do grupo de pesquisa de produção de PHB do PPGEBB UFPR, a proporção de 70:30 entre glicose comercial e glicerol foi aquela com um maior desenvolvimento de biomassa e acúmulo de PHB, tendo também uma diferença significativa dentro do conjunto estudado (dados não apresentados). Além disso, por mais que a proporção de 80:20 tenha sido a que gerou uma maior biomassa final, a condição estabelecida para futuros testes foi a de 70:30 visto que não houve grande diferença entre os resultados obtidos e tal proporção permite um maior uso do glicerol residual, favorecendo a diminuição dos custos de produção.

TABELA 4.7 – CRESCIMENTO DE *C. necator* EM DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE HIDROLISADO E GLICEROL RESIDUAL

Proporção entre hidrolisado e glicerol residual	Biomassa (g/L)
50:50	7,50 ± 0,42
60:40	7,60 ± 0,71
70:30	7,88 ± 0,67
80:20	7,95 ± 0,28
90:10	6,80 ± 1,06
100:0	7,15 ± 0,71

4.3.5. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento do microrganismo

A fonte de nitrogênio é um fator crítico tanto para o desenvolvimento microbiano quanto para a produção de diferentes metabólitos (NURFARAHIN et al., 2018). No caso do acúmulo de PHB, conforme discutido, a quantidade de nitrogênio no meio impacta diretamente em tal parâmetro, sendo assim essencial a escolha de uma fonte de nitrogênio que propicie um bom crescimento microbiano e produção do biopolímero. As fontes de nitrogênio escolhidas para este teste foram baseadas em estudos da literatura de otimização da produção de PHB (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; ARAMVASH et al., 2015).

A ureia foi a fonte de nitrogênio que propiciou um melhor desenvolvimento do microrganismo (com 9,72 g/L de biomassa final) quando comparada aos demais compostos testados (TABELA 4.8). Este resultado é consistente com os reportados na literatura, em que a ureia contribuiu de maneira mais significativa para o desenvolvimento microbiano utilizando diferentes fontes de carbono como frutose, óleo de tamaru e suco de caju (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; ARUMUGAM et al., 2018; ARUMUGAM et al., 2020; YANG et al., 2021). Dentre os componentes estudados, a ureia é a única fonte orgânica de nitrogênio, o que pode ter sido um dos motivos do melhor desenvolvimento microbiano observado, uma vez que ela pode ser mais facilmente transportada através da membrana por não se dissociar em íons e não ser dependente de pH, conforme elucidado por Tripathi e colaboradores (2013) (TRIPATHI et al., 2013). Além disso, a ureia é conhecida por ser uma fonte de nitrogênio mais barata quando comparada com sais inorgânicos, o que pode contribuir para a redução do custo geral do processo (TRIPATHI et al., 2013; KULPREECHA et al., 2009). Dessa maneira, a ureia foi escolhida como fonte de nitrogênio para os testes posteriores de otimização da composição do meio de fermentação.

TABELA 4.8 – CRESCIMENTO DE *C. necator* EM MEIO MSM COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO TENDO HIDROLISADO DE FRAÇÃO AMILÁCEA DO MILHO MOÍDO E GLICEROL RESIDUAL (PROPORÇÃO 70:30) COMO FONTE DE CARBONO

Fonte de nitrogênio	Biomassa (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,88 ± 0,67
NH_4Cl	7,40 ± 0,28
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	7,68 ± 0,46
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (Ureia)	9,72 ± 0,04

4.3.6. Avaliação do potencial de substituição do extrato de levedura por milhocina

A substituição do extrato de levedura (usado em 1g/L) por milhocina foi estudada no meio fermentativo, assim como para o inóculo, de acordo com a literatura (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Foram testadas diferentes concentrações

a fim de avaliar qual concentração era capaz de promover boa suplementação de nutrientes, sem causar inibição (KIBEOM et al., 2003; JUNG et al., 2010). Dessa maneira, não foi ultrapassado o valor de 10g/L de milhocina no meio fermentativo, acima do qual não houve crescimento do microrganismo, de acordo com o estudo do desenvolvimento do inóculo (Seção 4.3.2.2).

Em concentrações mais baixas, (1 e 2,5 g/L), a milhocina apresentou menor desempenho quando comparado com o uso do extrato de levedura como suplementação (TABELA 4.9). Entretanto, com o aumento deste componente no meio, houve um maior desenvolvimento de biomassa, atingindo o melhor resultado (8,73 g/L) em termos de biomassa final com 7,5 g/L de milhocina no meio. No meio fermentativo, nenhum efeito inibitório da milhocina foi observado. Isso se deve ao fato de que as concentrações aplicadas foram menores do que aquelas que geraram inibição no desenvolvimento do inóculo, mas também ao fato de que o microrganismo no meio fermentativo já possui uma maior adaptação aos demais componentes, além de uma maior suplementação de sais e outros nutrientes necessários para seu crescimento.

Apesar de a milhocina apresentar um melhor resultado no desenvolvimento do *C. necator* no meio de produção, foi mantido o extrato de levedura como fonte de nutrientes. Isso se deve à problemática de que foi necessário um aumento muito expressivo na quantidade da suplementação com milhocina (mínimo 5 g/L) para atingir resultados iguais ou superiores àqueles atingidos com extrato de levedura. Além disso, a milhocina contém sólidos residuais em sua composição (LAWFORD; ROUSSEAU, 1997), o que pode dificultar a separação da biomassa e consequente recuperação de PHB em testes futuros. Dessa maneira, decidiu-se por manter o extrato de levedura como suplementação de nutrientes no meio, com a perspectiva de diminuição de sua concentração através dos testes de otimização.

TABELA 4.9 – CRESCIMENTO DE *C. necator* EM MEIO MSM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MILHOCINA PARA SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

Fonte de nutrientes	Biomassa (g/L)
Milhocina 1 g/L	6,60 ± 1,27
Milhocina 2 g/L	6,98 ± 0,46
Milhocina 5 g/L	8,40 ± 0,42
Milhocina 7,5 g/L	8,73 ± 0,39
Extrato de levedura 1 g/L	7,88 ± 0,67

4.3.7. Efeito de diferentes relações C:N no crescimento do microrganismo e no acúmulo de PHAs

Conforme já discutido, o acúmulo de PHB se dá em condições de desequilíbrio de nutrientes. Uma das maneiras mais simples de se atingir essa condição é através do aumento da fonte de carbono, gerando seu excesso e consequente limitação dos demais nutrientes, entre eles o nitrogênio (ZAINAB-L et al., 2018). Em estudo realizado por Ahn e colaboradores (2015), a relação C:N para produção de PHB a partir de hidrolisados de palha de arroz com *C. nector* foi estudada na faixa entre 3,6:1 até 360:1, o que representaria 2 g/L até 200 g/L de açúcares no meio de fermentação mantendo a concentração da fonte de nitrogênio constante (AHN et al., 2015). Os autores relataram uma maior produção de PHB com o aumento da relação C:N, porém restringiram o intervalo estudado até uma relação de 36:1, visto que o aumento excessivo de açúcares poderia implicar em um aumento do custo de produção.

Similarmente, Zainab-L e colaboradores (2018) observaram que o aumento da relação C:N levava à um maior acúmulo de PHB, mas a biomassa obtida e, consequentemente, a concentração do produto ao final do tempo de processo eram menores (ZAINAB-L et al., 2018). Além disso, Wei e colaboradores (2011) relataram que o aumento da relação C:N de 8:1 para 20:1 gerou uma limitação no acúmulo

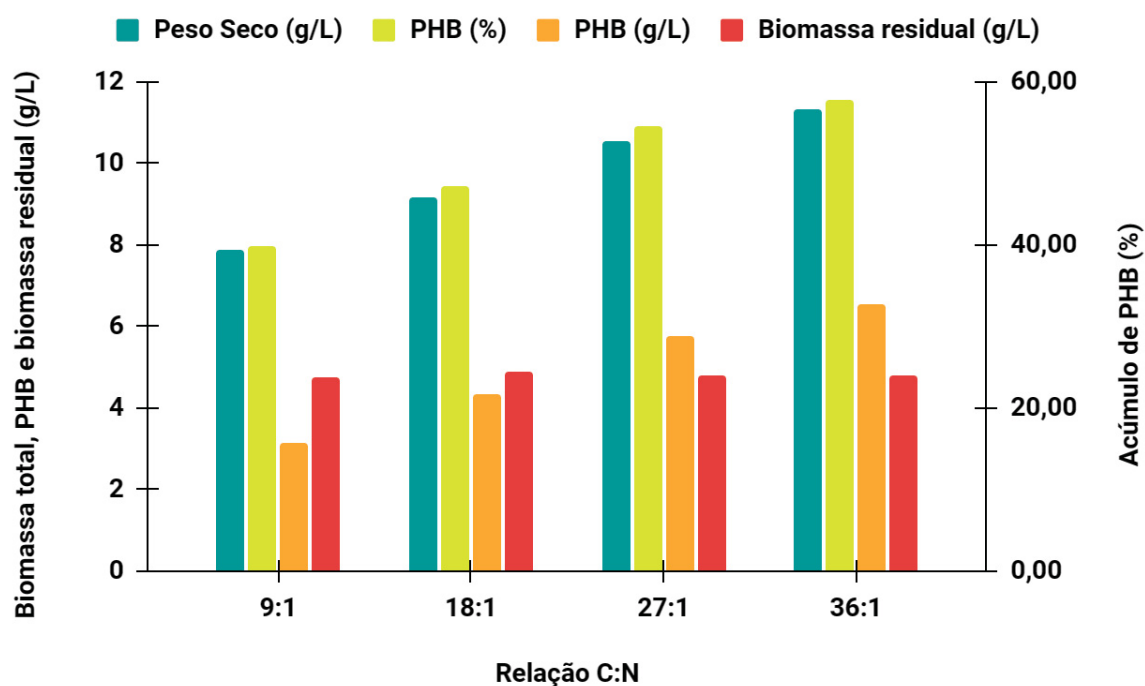
uma vez que a biomassa obtida em 20:1 C:N foi a menor reportada (WEI et al., 2011). Dessa maneira, é necessário encontrar um equilíbrio entre o acúmulo de PHB e o desenvolvimento microbiano, levando em consideração os requerimentos nutricionais e custos de processo. Foram então realizados testes de variação da relação C:N (mol/mol), aumentando-se a concentração da fonte de carbono (hidrolisado e glicerol residual em proporção de 70:30) e mantendo-se a concentração da fonte de nitrogênio (4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) constante nos testes.

Em termos da biomassa residual (definida aqui como o valor de biomassa obtida subtraindo o valor do peso seco pelo de concentração de PHB), os resultados se apresentaram semelhantes nas relações estudadas, demonstrando que o microrganismo foi capaz de se desenvolver de maneira semelhante, mesmo em concentrações mais altas de fonte de carbono (TABELA 4.10, FIGURA 4.2). Contudo, com o aumento da relação C:N é possível observar um claro aumento no acúmulo e concentração de PHB, com o melhor resultado sendo obtido na relação de 36:1 com 57,68% de acúmulo e 6,35 g/L de PHB. Por mais que tal aumento tenha sido constatado, é possível observar também que não houve grande diferença nos resultados das relações 27:1 (54,88% de acúmulo e 5,74 g/L de PHB), demonstrando que o limite de aumento da fonte de carbono estava sendo atingido. Dessa maneira, para os testes de otimização, visou-se também a variação da concentração de fonte de nitrogênio no meio a fim de encontrar o melhor equilíbrio entre a relação C:N sem o aumento excessivo de açúcares. Além disso, o fosfato, presente no meio – na forma de seu sal KH_2PO_4 – também é reportado como um nutriente que poderia impactar no acúmulo de PHB em condições de limitação (AMINI et al., 2020). Assim, visa-se também o estudo da influência desse componente no meio de cultivo para a produção do biopolímero, uma vez que sua concentração inicial pode ser considerada alta (13,3 g/L). Os picos obtidos no cromatograma possuíam o mesmo tempo de retenção quando comparado ao PHB padrão, demonstrando assim que o tipo do biopolímero obtido é o desejado.

TABELA 4.10 – CRESCIMENTO DE *C. necator* E PRODUÇÃO DE PHB EM DIFERENTES RELAÇÕES ENTRE CARBONO E NITROGÊNIO

Relação C:N	Concentração da fonte de C (g/L)	Peso seco (g/L)	Acúmulo de PHB (%)	PHB (g/L)	Biomassa residual (g/L)
9:1	20	7,88 ± 0,67	39,88	3,14	4,73
18:1	40	9,14 ± 0,74	47,04	4,31	4,86
27:1	60	10,55 ± 0,78	54,88	5,74	4,80
36:1	80	11,33 ± 0,88	57,68	6,53	4,79

FIGURA 4.2 – CRESCIMENTO DE *C. necator* E PRODUÇÃO DE PHB EM DIFERENTES RELAÇÕES ENTRE CARBONO E NITROGÊNIO



Fonte: A autora (2022)

4.3.8. Otimização da composição do meio de produção

4.3.8.1. Primeira etapa de otimização - Planejamento experimental Plackett-Burman (PB) para o *screening* de variáveis significativas

Em bioprocessos, diversos fatores podem afetar o desenvolvimento microbiano e a produção de biomoléculas, sendo assim necessário estudar a influência de diferentes componentes em tais respostas. Se estudadas isoladamente, o número de ensaios necessários para determinar a importância das variáveis se torna amplo e praticamente inviável de se realizar em laboratório. Entretanto, através de planejamentos experimentais, é possível reduzir o número de ensaios, tornando tal estudo factível. Dessa maneira, um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman foi aplicado para determinar, através de análise estatística do p-valor e t-valor, a influência dos diferentes componentes do meio de produção para diferentes respostas: peso seco, acúmulo de PHB, concentração do bioproduto e biomassa residual ao final do processo. Um total de 7 variáveis foi estudado – fonte de carbono (F.C.), ureia, extrato de levedura (E.L.), ácido cítrico (A.C.), $MgSO_4$, KH_2PO_4 e a solução de elementos traços (TES) – e o design de 11 variáveis e 12 ensaios do PB foi escolhido, permitindo assim 4 graus de liberdade. O intervalo de concentrações estudadas (-1 e +1) foi determinado através dos valores utilizados no meio de referência (CAVALHEIRO et al., 2009), além de intervalos determinados na literatura (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; ARAMVASH et al., 2015).

Os melhores resultados de produção de biomassa, acúmulo e produção de PHB foram obtidos no ensaio 1, o qual gerou um peso seco de 20,7 g/L com 63,87% de acúmulo de PHB, representando 13,221 g/L de biopolímero acumulado e biomassa de 7,48 g/L (TABELA 4.11). Tal condição contava com maior quantidade de fonte de carbono e limitação da fonte de nitrogênio (ureia) e fosfato, demonstrando assim a necessidade de tais condições de desbalanço para um maior acúmulo do biopolímero. Além disso, é possível observar que os ensaios que contavam com maior concentração de KH_2PO_4 (4, 6, 7, 9, 10, 11) não somente uma concentração baixa de PHB foi obtida (variando de 0,05 a 1,27), como também um baixo desenvolvimento de biomassa foi observado (máximo de 5,75 g/L de peso seco e 4,48 g/L de biomassa residual na condição 7), demonstrando então que tal fator não influencia somente no acúmulo de PHB conforme já citado, mas também no desenvolvimento microbiano e pode estar em excesso na concentração sendo aplicada no meio de produção.

TABELA 4.11 – RESULTADOS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PB PARA SCREENING DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS

Ensaio	F.C. (g/L)	Ureia (g/L)	E.L. (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	TES (mL/L)	DCW (g/L)	PHB (%)	PHB (g/L)	Biomassa residual (g/L)
1	70	1	3	0	1	5	15	20,70	63,87	13,22	7,48
2	70	5	0	3	1	5	5	14,63	62,97	9,21	5,42
3	10	5	3	0	5	5	5	7,68	2,69	0,21	7,47
4	70	1	3	3	1	20	5	0,85	36,70	0,31	0,54
5	70	5	0	3	5	5	15	10,88	57,09	6,21	4,67
6	70	5	3	0	5	20	5	2,65	2,11	0,05	2,59
7	10	5	3	3	1	20	15	5,75	22,14	1,27	4,48
8	10	1	3	3	5	5	15	6,58	14,50	0,95	5,63
9	10	1	0	3	5	20	5	5,37	16,55	0,89	4,48
10	70	1	0	0	5	20	15	0,88	20,30	0,18	0,70
11	10	5	0	0	1	20	15	3,55	19,21	0,68	2,89
12	10	1	0	0	1	5	5	4,87	4,85	0,24	4,63

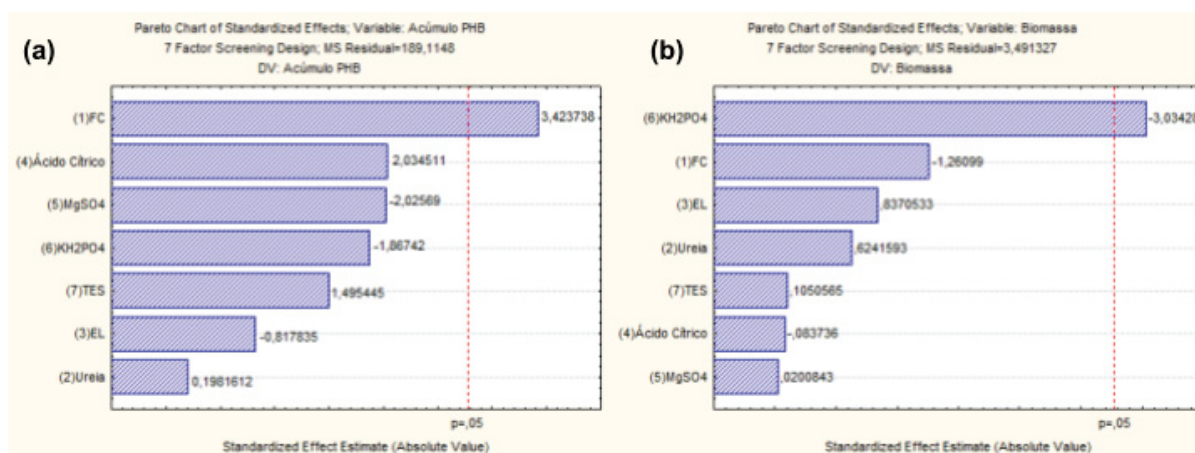
As quatro respostas obtidas foram submetidas às análises estatísticas para determinar as variáveis a serem selecionadas para futuros testes de otimização. Em tais análises, as respostas de peso seco e concentração de PHB não foram conclusivas uma vez que não apresentaram variáveis com p-valor < 0,05 (dados não apresentados). Isso pode decorrer do fato que – com exceção de alguns ensaios como os de número 1, 2 e 5 –, a variação observada nas respostas não se apresentou tão expressiva, o que levou a não possibilidade do cálculo da influência das variáveis estudadas. Todavia, dentre as variáveis, as que apresentaram maior t-valor para ambas as respostas foram o KH₂PO₄ com um valor negativo e a fonte de carbono com um positivo. Faz-se assim a associação de que uma maior quantidade de fonte de carbono no meio, com uma limitação de KH₂PO₄ pode ser positiva para a produção do biopolímero em questão.

As respostas de biomassa residual e acúmulo de PHB, por sua vez, apresentaram resultados mais variados entre si e a análise estatística da influência das variáveis levou aos resultados apresentados na TABELA 4.12. Para a resposta de biomassa, o KH_2PO_4 se apresentou estatisticamente significativo (com p-valor de 0,034) com um t-valor negativo. Já para o acúmulo, a variável significativa encontrada foi a fonte de carbono com p-valor de 0,027 e t-valor positivo (FIGURA 4.3). Isso demonstra o que já foi constatado, ou seja, que o excesso da fonte de carbono contribui para um maior acúmulo de PHB intracelular e que o KH_2PO_4 estava sendo usado em um provável excesso, o que poderia restringir os resultados obtidos anteriormente. Além disso, para a biomassa, a fonte de carbono não se mostrou significativa, mas teve um t-valor negativo, o que demonstra que uma menor concentração de carbono poderia ser positiva para o desenvolvimento de biomassa, o que contraria o acúmulo de PHB. Dessa maneira, é necessário encontrar uma concentração ideal desse componente que permita um bom crescimento microbiano, mas também uma boa produção de biopolímero. Além disso, é possível observar que o ácido cítrico foi uma variável com efeito positivo no acúmulo de PHB. Isso decorre do fato que tal componente ajuda a desviar a rota metabólica ao inibir o ciclo do ácido cítrico (TCA) (ZHANG et al., 2008). A ureia e o extrato de levedura apresentaram efeitos diametralmente opostos (t-valor) com biomassa e acúmulo como resposta, sendo o mesmo caso da fonte de carbono – que precisa de um equilíbrio para as duas respostas encontradas. Dessa maneira, no ensaio de otimização descrito na próxima seção (4.3.9) foram adotadas três variáveis: fonte de carbono (hidrolisado:glicerol 70:30), KH_2PO_4 e fonte de nitrogênio (ureia:extrato de levedura 4:1). Vale ressaltar que a ureia e o extrato de levedura foram otimizados como apenas uma variável com o objetivo de encontrar o melhor ponto entre esses dois fatores que possibilitasse a maior produção de biomassa com o maior acúmulo de biopolímero.

TABELA 4.12 – ESTATÍSTICAS OBTIDAS PARA AS RESPOSTAS DE BIOMASSA RESIDUAL (g/L) E ACÚMULO DE PHB (%)

Fator	Biomassa residual ($R^2 = 0,74852$)			Acúmulo ($R^2 = 0,86841$)		
	Efeito	<i>t</i> -valor	<i>p</i> -valor	Efeito	<i>t</i> -valor	<i>p</i> -valor
Fonte de Carbono	-1,36033	-1,26099	0,275848	27,1833	3,42374	0,026688
Ureia	0,67333	0,62416	0,566356	1,5733	0,19816	0,852583
Extrato de Levedura	0,903	0,83705	0,449658	-6,4933	-0,81783	0,459369
Ácido Cítrico	-0,09033	-0,08374	0,937289	16,1533	2,03451	0,111638
MgSO ₄	0,02167	0,02008	0,984938	-16,0833	-2,02569	0,112764
KH ₂ PO ₄	-3,27333	-3,03428	0,038618	-14,8267	-1,86742	0,135235
TES	0,11333	0,10506	0,921388	11,8733	1,49545	0,209122

FIGURA 4.3 – DIAGRAMAS DE PARETO OBTIDOS PARA AS RESPOSTAS DE (a) ACÚMULO (%) DE PHB e (b) BIOMASSA RESIDUAL (g/L)



Fonte: A autora (2022)

4.3.8.2. Segunda etapa de otimização - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização das variáveis selecionadas

Determinadas as variáveis significativas, as suas concentrações foram otimizadas através de um planejamento experimental do tipo DCCR 2³. As quatro

respostas obtidas (peso seco, acúmulo e concentração de PHB e biomassa residual) foram submetidas à análise estatística assim como no PB, para elaboração de modelo matemático a fim de determinar as concentrações ótimas das variáveis estudadas visando o máximo resultado que pode ser obtido. Os melhores resultados alcançados neste experimento corresponderam aos ensaios de número 5 e 7, os quais mostraram um peso seco de 19,45 e 17,2 g/L, acúmulo de 63,96 e 66,28% o que representa 12,44 e 11,40 g/L de PHB e 7 e 5,8 g/L de biomassa residual, respectivamente (TABELA 4.13). Ambos os ensaios contavam com um excesso de fonte de carbono (60 g/L) e limitação de fosfato (5 g/L). Além disso, destacam-se os resultados obtidos na condição 9, os quais foram os menores dentro do conjunto estudado (com somente 3,03% de acúmulo de PHB), uma vez que correspondia ao ponto axial negativo (-1,68) da concentração de fonte de carbono e na condição 11, o qual apresentou o maior acúmulo de biopolímero reportado (74,26%), correspondendo ao ponto axial negativo da concentração de fonte de nitrogênio.

TABELA 4.13 – RESULTADOS OBTIDOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2³

Ensaio	Fonte C	Fonte N	KH ₂ PO ₄	Peso seco (g/L)	Acúmulo PHB (%)	PHB (g/L)	Biomassa Residual (g/L)
1	20	2,5	5	10,25	27,24	2,792	7,458
2	20	2,5	15	11,75	37,55	4,412	7,338
3	20	7,5	5	10,25	32,17	3,297	6,953
4	20	7,5	15	11,6	39,50	4,582	7,018
5	60	2,5	5	19,45	63,96	12,441	7,009
6	60	2,5	15	7,7	41,52	3,197	4,503
7	60	7,5	5	17,2	66,28	11,400	5,800
8	60	7,5	15	9,25	51,65	4,777	4,473
9	6,4	5	10	4,2	3,03	0,127	4,073
10	73,6	5	10	14,75	61,27	9,038	5,712
11	40	0,8	10	15,75	74,26	11,695	4,055
12	40	9,2	10	16,1	63,30	10,192	5,908
13	40	5	1,6	16,25	51,58	8,381	7,869
14	40	5	18,4	10,05	58,14	5,843	4,207
15	40	5	10	16,9	62,40	10,545	6,355
16	40	5	10	16,6	57,09	9,478	7,122

A resposta da biomassa residual, quando submetida a análise estatística para gerar o modelo matemático, foi a que demonstrou um menor ajuste aos dados experimentais, com um R^2 de 0,49275 (TABELA 4.14). Diferentemente do observado no planejamento experimental PB, tal resposta nos experimentos de DCCR demonstrou uma menor variação (com mínimo de 4,08 e máximo de 7,87, enquanto no PB a variação ia de 0,54 a 7,48). Isso pode decorrer do fato de que no PB, mais variáveis foram estudadas em níveis mais extremos, testando-se até mesmo a ausência de alguns componentes. Já no DCCR, uma faixa menor de valores foi estudada, assim como menos variáveis. Além disso, os valores superiores (+1) e axial positivo do KH_2PO_4 , que foram 15 e 18,4 g/L, respectivamente, foram menores do que o superior estudado no PB (20 g/L). Isso pode demonstrar que tal variável realmente possui a influência determinada em tal resposta, uma vez que com sua diminuição, o crescimento celular foi maior.

As demais respostas e consequentes modelos gerados (peso seco, acúmulo e concentração de PHB) demonstraram um bom ajuste aos dados experimentais, com valores de R^2 superiores à 0,9 (TABELA 4.14). Nos três casos, a variável da fonte de nitrogênio e suas interações com as demais estudadas não apresentaram significância estatística (p -valor > 0,05). De certa maneira, esse resultado poderia ser esperado uma vez que durante o PB, tal componente apresentou um comportamento similar. Entretanto, ainda é possível observar que a redução da concentração da fonte de nitrogênio pode promover um maior acúmulo do biopolímero (demonstrado pela Condição 11, com 74% de PHB). A não significância dessa variável pode ser atribuída em certo grau à faixa de valores estudada, a qual pode ter sido limitada para entender o real efeito dela nos resultados. Apesar da não significância apresentada pela fonte de nitrogênio, o modelo gerado ainda pode ser utilizado para descrever os resultados obtidos e obter previsões de resultados críticos.

Dessa maneira, através do *software Statistica*® 5.0, os modelos foram ajustados, desconsiderando as interações não significativas (entre fonte de nitrogênio e demais variáveis). Através de tal ajuste, o R^2 dos modelos originais foram ligeiramente menores, porém os R^2 ajustados aumentaram, permanecendo todos acima de 0,8. Isso demonstra que os dados experimentais estão bem representados pelos modelos definidos. Em todos os modelos, os efeitos linear e

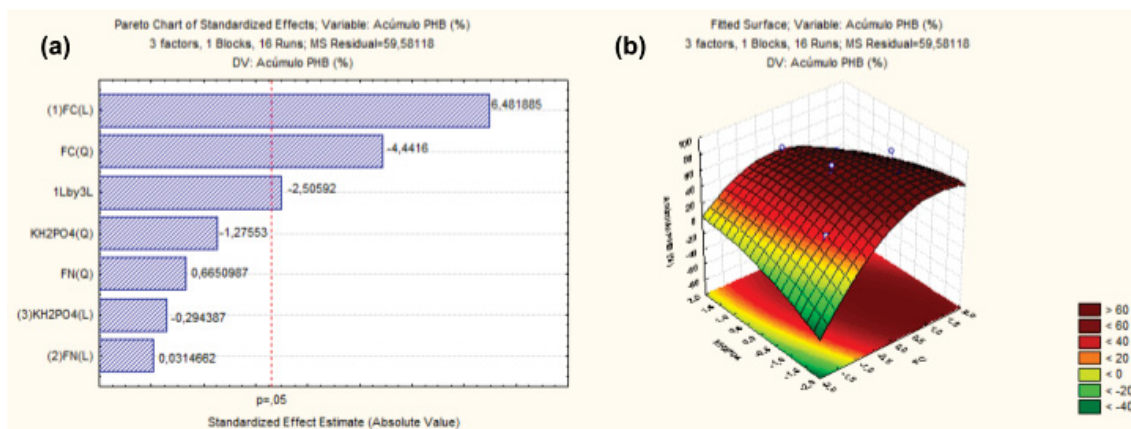
quadrático da fonte de carbono e a interação entre essa variável com o KH_2PO_4 foram significativas (FIGURAS 4.4a, 4.5a, 4.6a). As superfícies de resposta Carbono vs. Fosfato (FIGURAS 4.4b, 4.5b, 4.6b) demonstram que a maior resposta é obtida com uma maior concentração da fonte de carbono e uma limitação do KH_2PO_4 . Tais resultados são consistentes com o que já foi discutido durante o trabalho, demonstrando o metabolismo de acúmulo e produção do biopolímero ocorre em condições de excesso de carbono e limitação de nutrientes, não somente o nitrogênio. Para as respostas de peso seco e concentração de PHB, os efeitos linear e quadrático do KH_2PO_4 também foram significativos. Isso se reflete também no R^2 de tais modelos, que foram maiores do que para o acúmulo de PHB. Possuindo um maior número de variáveis significativas, o modelo se ajusta melhor aos dados experimentais.

TABELA 4.14 – ESTATÍSTICAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DCCR 2³

Modelo	R ²	R ² Adj	Erro	MS Residual
Peso Seco (g/L)	0,94285	0,85713	15,1527	2,52545
Peso seco (g/L) Ajustado*	0,93643	0,88081	16,8558	2,10698
PHB (g/L)	0,93644	0,84109	13,8509	2,30848
PHB (g/L) Ajustado*	0,93343	0,87518	14,5064	1,8133
Acúmulo PHB (%)	0,90607	0,76517	469,855	78,309
Acúmulo PHB (%) Ajustado*	0,90471	0,82133	476,649	59,581
Biomassa (g/L)	0,49275	0	-	2,297069

*Ajustes realizados através da exclusão dos efeitos de interação não significativos (com p-valor > 0,05). Nesses casos, as interações entre Fonte de Nitrogênio e Fonte de Carbono e Fonte de Nitrogênio e KH_2PO_4

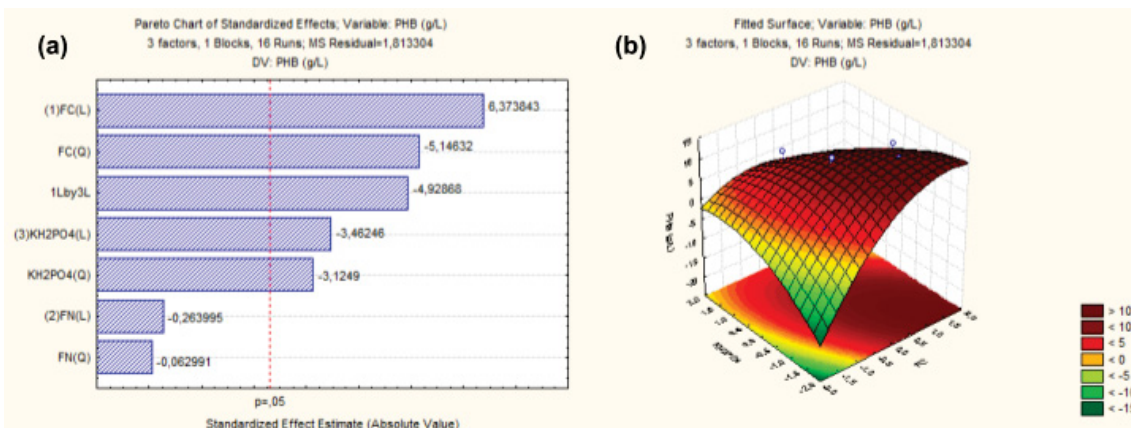
FIGURA 4.4 – EFEITO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FOSFATO NO ACÚMULO DE PHB



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) DIAGRAMA DE PARETO (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE FONTE DE CARBONO VS. KH_2PO_4

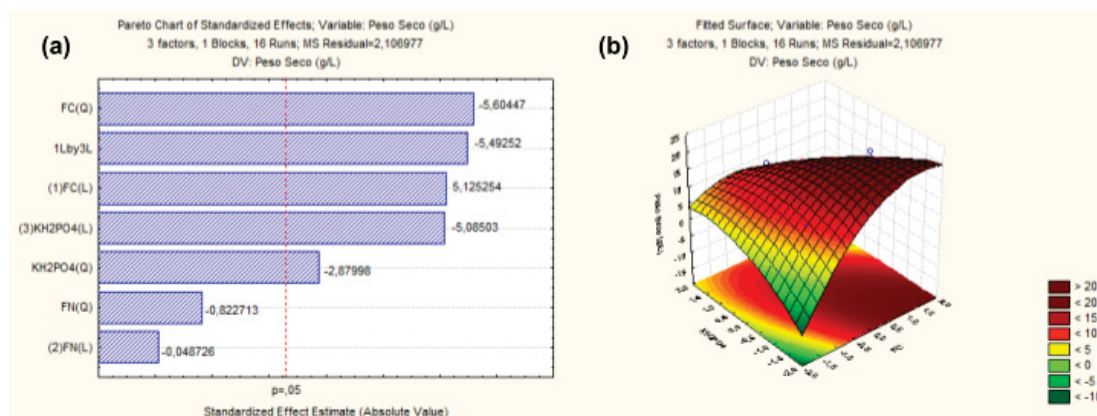
FIGURA 4.5 – EFEITO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FOSFATO NO CONCENTRAÇÃO DE PHB



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) DIAGRAMA DE PARETO (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE FONTE DE CARBONO VS. KH_2PO_4

FIGURA 4.6 – EFEITO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FOSFATO NO PESO SECO



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) DIAGRAMA DE PARETO (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE FONTE DE CARBONO VS. KH_2PO_4

Os modelos foram então gerados com base nos coeficientes fornecidos pelo *software Statistica*® 5.0 (TABELA 4.15), resultando em três equações que descrevem o que é esperado para peso seco, acúmulo e concentração de PHB (equações 4.5, 4.6, 4.7). É possível observar que os coeficientes possuem sinais similares uma vez que as respostas analisadas estão diretamente conectadas entre si. O peso seco é diretamente influenciado pelo acúmulo de PHB, uma vez que um maior acúmulo do biopolímero gera uma massa que influencia ao final do processo de mensuração de tal variável. Além disso, em termos gerais, quanto maior o acúmulo e o peso seco, maior será a concentração de PHB ao final da fermentação. Assim, é natural de se esperar que as equações obtidas possuam semelhanças.

TABELA 4.15 – COEFICIENTES E p-valores OBTIDOS PARA OS DIFERENTES MODELOS GERADOS

Modelo	Peso seco (g/L)		Acúmulo PHB (%)		PHB (g/L)	
	Coefficiente	p-valor	Coefficiente	p-valor	Coefficiente	p-valor
Média	16,7917	0	60,3695	0,000004	10,15954	0,000005
Fonte C (L)	2,01312	0,000901	13,5388	0,000192	2,32253	0,000215
Fonte C (Q)	-2,67278	0,000508	-11,2640	0,002163	-2,27683	0,000878
Fonte N (L)	-0,01914	0,962333	0,0657	0,975669	-0,0962	0,798457
Fonte N (Q)	-0,39235	0,434507	1,6867	0,524694	-0,02787	0,951319
KH ₂ PO ₄ (L)	-1,99732	0,000947	-0,6149	0,775956	-1,26167	0,008537
KH ₂ PO ₄ (Q)	-1,37347	0,020512	-3,2348	0,237911	-1,38251	0,014124
Interação C e P	-2,81875	0,000579	-6,8388	0,036603	-2,3465	0,001151

$$DCW = 16,7917 + 2,01312*C - 2,67278*C^2 - 0,01914*N - 0,39235*N^2 - 1,99732*P - 1,37347*P^2 - 2,81875*C*P \quad (\text{equação 4.5})$$

$$Acúmulo = 60,3695 + 13,5388*C - 11,2640*C^2 + 0,0657*N + 1,6867*N^2 - 0,6149*P - 3,2348*P^2 - 6,8388*C*P \quad (\text{equação 4.6})$$

$$PHB \text{ (g/L)} = 10,15954 + 2,32253*C - 2,27683*C^2 - 0,0962*N - 0,02787*N^2 - 1,26167*P - 1,38251*P^2 - 2,3465*C*P \quad (\text{equação 4.7})$$

A fim de validar os modelos obtidos, os valores críticos das variáveis foram calculados com o *software Statistica*® 5.0 para obter o máximo da variável resposta. No caso do modelo obtido para o peso seco como resposta, o valor crítico calculado do KH₂PO₄ estava fora da faixa estudada (entre -1,68 até +1,68), gerando assim um valor negativo (-2,1 g/L) desta variável para a resposta máxima. Dessa maneira, este modelo não foi validado visto que não se considerou razoável a

retirada completa de KH_2PO_4 do meio fermentativo pois este componente ainda é necessário para o desenvolvimento da biomassa. Para o modelo que representa a concentração de PHB, o valor crítico calculado da fonte de nitrogênio também encontrou-se fora da faixa estudada (variável codificada em -1,72, correspondendo à 0,7 g/L). Entretanto, como o valor estava ainda próximo do mínimo estabelecido e não era negativo (não gerando assim uma ausência dos componentes correspondentes no meio), a condição foi testada. Além disso, a condição 5 que apresentou os melhores resultados no experimento de DCCR também foi reavaliada.

Os resultados obtidos dos testes de validação foram satisfatórios, com os valores experimentais se ajustando ao modelo dentro do esperado através da comparação com R^2 (TABELA 4.16). No modelo de concentração de PHB, um elevado acúmulo foi reportado (80,18%), decorrendo do fato de que apresentava a maior concentração de fonte de carbono dentre as condições estudadas, junto das menores quantidades de fonte de nitrogênio e fosfato. Entretanto, a condição que apresentou a maior concentração de PHB ao final do processo (14,30 g/L) foi a repetição do ensaio 5, devido ao maior peso seco apresentado (21,33 g/L). Esses resultados representam um aumento de 119 e 85% quando comparados aos resultados iniciais de peso seco e produção de PHB, respectivamente, obtidos no ensaio de relação carbono nitrogênio quando a maior proporção entre C:N (36:1) foi aplicada. Por esse motivo e pelo potencial reservado na biomassa residual dessa condição (7,03 g/L) para futuros testes de modos de operação, em que a fonte de carbono será alimentada gradualmente no processo, a condição 5 foi escolhida e estabelecida para testes de cinética.

TABELA 4.16 – RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DOS MODELOS GERADOS

Fator/Modelo	DCW	PHB (g/L)	PHB (%)	Condição 5
Fonte C (g/L)	73	66	60	60
Ureia (g/L)	4	0,56	4	2
Extrato levedura (g/L)	1	0,14	1	0,5
KH ₂ PO ₄ (g/L)	-2,1	2	4,6	5
Resposta esperada DCW (g/L)	20,80	-	-	19,45
Resposta esperada PHB (g/L)	-	12,77	-	12,41
Resposta esperada Acúmulo (%)	-	-	66,07	63,96
Peso seco (g/L)	-	17,05	19,1	21,33
Acúmulo (%) obtido	-	80,18	62,09	64,46
PHB (g/L) obtido	-	13,67	11,63	14,30
Porcentagem validação (%)	-	93,41	93,97	92,29
R ² do modelo	0,93643	0,93343	0,90607	-

Os gráficos de valores observados e preditos dos modelos ajustados e não ajustados, assim como os gráficos de Pareto dos modelos não ajustados e as superfícies de resposta fonte de Carbono vs. de Nitrogênio e de Nitrogênio vs. KH₂PO₄ se encontram no Apêndice 2.

4.3.9. Cinética de crescimento do microrganismo e produção de PHB em frascos de Erlenmeyer

O acompanhamento da cinética de produção de *C. necator* e acúmulo de PHB foi conduzido por 96 horas (FIGURA 4.7). Quanto à biomassa produzida, é possível observar que a fase exponencial iniciou em torno de 18 horas de processo (com 2,22 g/L de biomassa), se prolongando até 60 horas, atingindo 6,05 g/L. Após esse tempo, o começo da fase estacionária foi observada, com um crescimento

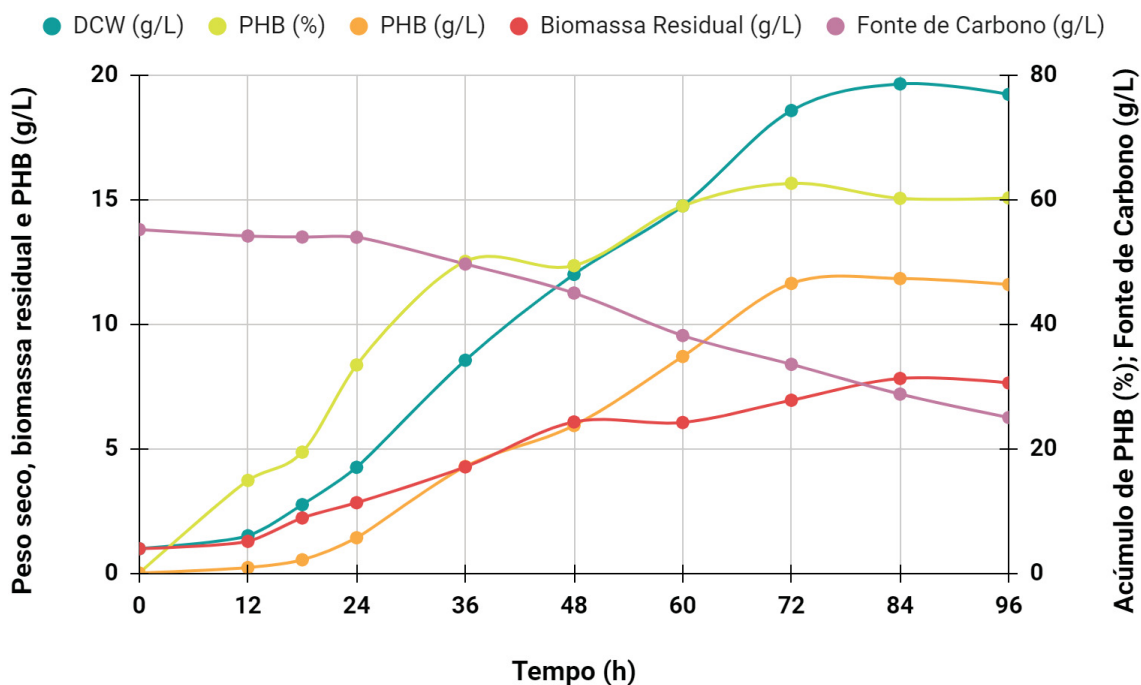
máximo de 7,82 g/L no tempo de 84 horas. A produtividade máxima de biomassa foi obtida em 48 horas sendo 0,113 g/L.h.

Quanto ao acúmulo de PHB, é observado que entre 18 e 48 horas de processo, há alto desenvolvimento do biopolímero variando de 20 a 55%. O máximo observado foi atingido em 72 horas com 62% e, após esse tempo uma fase estacionária pode ser observada. A produção de PHB, dessa maneira, possui um padrão similar com o início da produção entre 18 e 24 horas e o máximo sendo atingido em 72 horas, com 11,64 g/L – equivalente à maior produtividade obtida de 0,162 g/L.h de biopolímero. O desenvolvimento da biomassa seca possui um comportamento semelhante, principalmente referente à estabilização dos valores obtidos a partir de 72 horas (com 18,58 g/L). É possível então concluir que o tempo de fermentação pode ser reduzido para 72 horas sem maiores perdas em termos de rendimento e produtividade, fazendo com que os custos de processo também sejam menores. Tais resultados se comparam positivamente aos obtidos em outros estudos da literatura nas condições de fermentação em frascos de Erlenmeyer. Poomipuk e colaboradores (2014) produziram PHB a partir de hidrolisado de amido de mandioca utilizando-se de um isolado de *C. necator*, obtendo máximo acúmulo de 61% do biopolímero, o que representa 5,97 g/L em 96 horas (com uma produtividade correspondente de 0,04 g/L.h) (POOMIPUK et al., 2014). Saratale e Oh (2015) desenvolveram a produção de PHB a partir de *C. necator* utilizando-se do hidrolisado da fração lignocelulósica da palha de soja, obtendo 62% de acúmulo (6,67 g/L em 48 horas com produtividade de 0,16 g/L.h) (SARATALE; OH, 2015).

Quanto ao consumo da fonte de carbono, a glicose presente no hidrolisado de milho moído foi consumida durante toda a fermentação, sendo exaurida ao final do processo. Em 72 horas, foi constatado um consumo de 85% dessa fonte. Por sua vez, o glicerol teve um baixo consumo, chegando-se em 18% em 84 horas e permanecendo no caldo fermentado ao final do processo. Isso reforça o que foi relatado anteriormente, ou seja, o microrganismo possui preferência metabólica por açúcares simples, mais especificamente a glicose, enquanto o glicerol permanece no meio de cultivo como uma fonte de carbono extra servindo até mesmo como um fator de estresse, o que favorece o acúmulo do biopolímero estudado. Além disso, o consumo total de glicose ocorreu ao final do processo. Dessa maneira, não houve tempo do microrganismo alterar seu metabolismo para o consumo de glicerol.

Outros autores reportaram igualmente o excesso de glicerol ao final da fermentação, mesmo sendo a única fonte de carbono, como no caso de Cavalheiro e colaboradores (2009) em que o modo de operação de batelada alimentada foi aplicada e, ao final do processo, foram quantificados 65 g/L de glicerol (CAVALHEIRO et al., 2009). Rodríguez-Contreras e colaboradores (2015) utilizaram o glicerol como fonte de alimentação para o processo de batelada alimentada e glicose como fonte de carbono inicial em uma concentração de 40 g/L. Neste caso, uma concentração residual de 30 g/L de glicerol foi reportada (RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2015). Até mesmo em resultados obtidos dentro do grupo de pesquisa do PPGEBB UFPR, o consumo máximo reportado de glicerol utilizando o *C. necator* foi de 40% em 96 horas (iniciando a fermentação com 14 g/L de açúcares redutores e 6 g/L de glicerol) (SARMIENTO-VÁSQUEZ et al., 2022), com acúmulo máximo de PHB reportado em 40%.

FIGURA 4.7 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *C. necator*, ACÚMULO E PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DA FONTE DE CARBONO UTILIZANDO MEIO MSM OTIMIZADO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER



Fonte: A autora (2022)

4.3.10. Cinética de crescimento do microrganismo e produção de PHB em biorreator de bancada

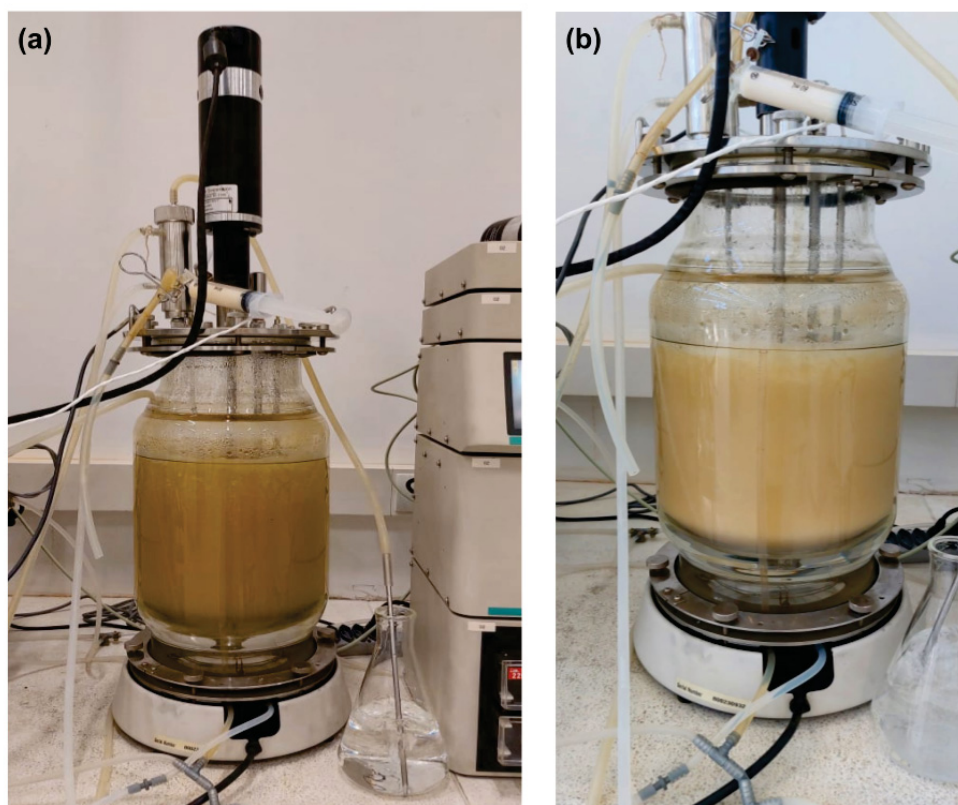
Para avaliar a possibilidade de escalonamento do processo fermentativo, o processo de produção de PHB foi realizado em biorreator de bancada BioFlo 110 da marca New Brunswick Scientific de 10 litros de volume total, com 8 litros de volume operacional foi conduzido com as condições descritas na seção 4.2.10. Durante o tempo de fermentação, foi possível observar a mudança de cor e turbidez do meio (FIGURA 4.8), indicando o crescimento do *C. necator*. O desenvolvimento de biomassa durante este experimento contou com uma fase exponencial entre 12 e 42 horas de processo, indo de 1,40 a 6,11 g/L (FIGURA 4.9). A partir das 60 horas, atingiu-se fase estacionária, sendo o máximo reportado ao final do processo de 7,79 g/L, o que representa uma produtividade de 0,081 g/Lh.

O acúmulo de PHB mostrou um comportamento similar àquele observado na cinética em frascos de Erlenmeyer, onde ocorreu um rápido acúmulo de PHB a partir de 24 horas de processo. Entretanto, no caso do biorreator, o acúmulo se estendeu exponencialmente até às 60 horas de processo (65%) e teve seu máximo em 72 horas (69%), apresentando um leve declínio ao final do processo, em que 66% de acúmulo foi reportado. Seguindo tal padrão, a concentração de PHB teve um crescimento expressivo entre 24 e 60 horas, tempo no qual a maior produtividade foi reportada (de 0,207 g/L.h, representando 12,42 g/L do biopolímero). A máxima concentração de PHB obtida foi observada ao final do processo, com 15,29 g/L (produtividade de 0,159 g/L.h). Diferentemente da cinética em frascos de Erlenmeyer, a glicose foi mais rapidamente consumida em biorreator, sendo completamente exaurida em 60 horas de processo. Já o glicerol apresentou resultados semelhantes: somente 15% dessa fonte foi consumida ao final do processo.

Assim como proposto na seção 4.3.9, o tempo de processo pode ser reduzido para 72 horas, pois é possível observar pela Figura 4.9 que todos os parâmetros atingiram uma certa estabilidade em tal tempo. Tal redução de tempo de processo pode implicar em menores custos, além de maior produtividade. Foram alcançados em 72 horas 20,25 g/L de biomassa seca produzidas (produtividade correspondente de 0,281 g/Lh), com aproximadamente 70% de acúmulo de PHB, o que gera cerca de 14,17 g/L (0,197 g/Lh) e 6,80 g/L de biomassa residual. Dalsasso

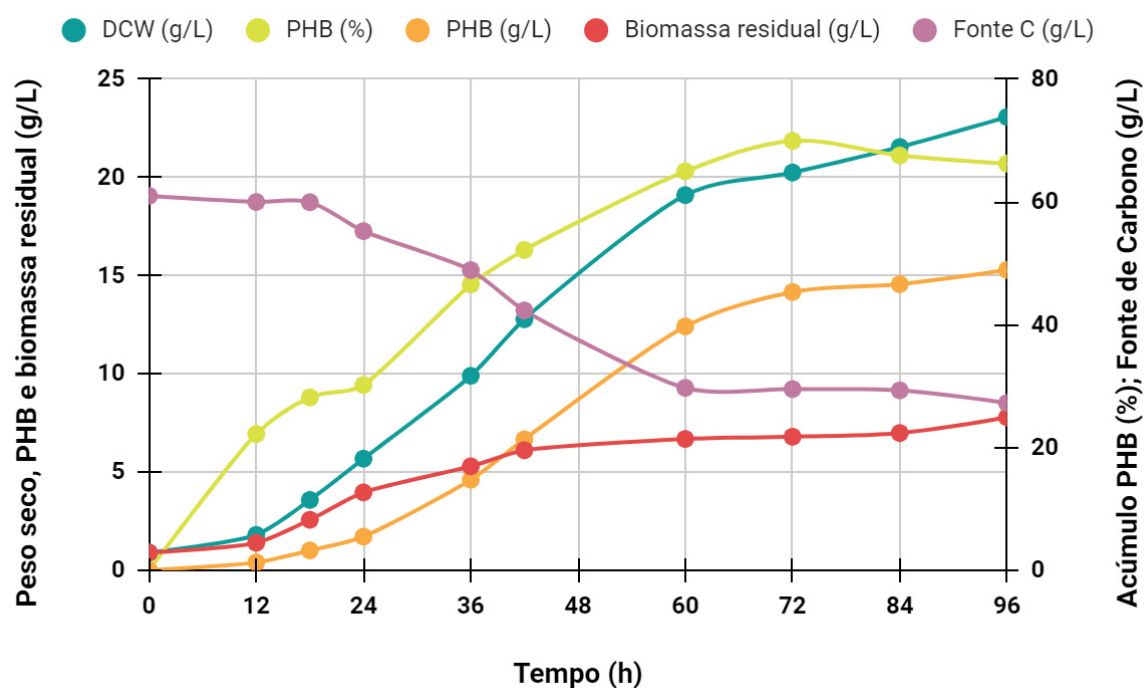
e colaboradores (2019) obtiveram em seu estudo da fermentação em batelada alimentada de melaço e vinhaça de cana com *C. necator* 56% de acúmulo de PHB em 50 horas de processo, o que representa 11,7 g/L (0,234 g/L.h) (DALSASSO et al., 2019). Já García-Torreiro e colaboradores (2016), utilizando o modo de operação de batelada com fermentação de hidrolisado amiláceo de cereal por *Halomonas boliviensis*, obtiveram acúmulo de 57% o que equivale a 16,3 g/L de PHB em 64 horas de fermentação (produtividade de 0,254 g/L.h) (GARCÍA-TORREIRO et al., 2016a). Os resultados obtidos no presente trabalho se comparam positivamente aos apresentados na literatura, demonstrando a viabilidade de implementação futura do processo desenvolvido.

FIGURA 4.8 – PRODUÇÃO DE PHB EM BIORREATOR DE BANCADA COM 8 LITROS DE VOLUME OPERACIONAL EM (a) 0h (b) 18h



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 4.9 – CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *C. necator*, ACÚMULO E PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DA FONTE DE CARBONO UTILIZANDO MEIO MSM OTIMIZADO EM BIORREATOR DE BANCADA COM VOLUME OPERACIONAL DE 8 LITROS

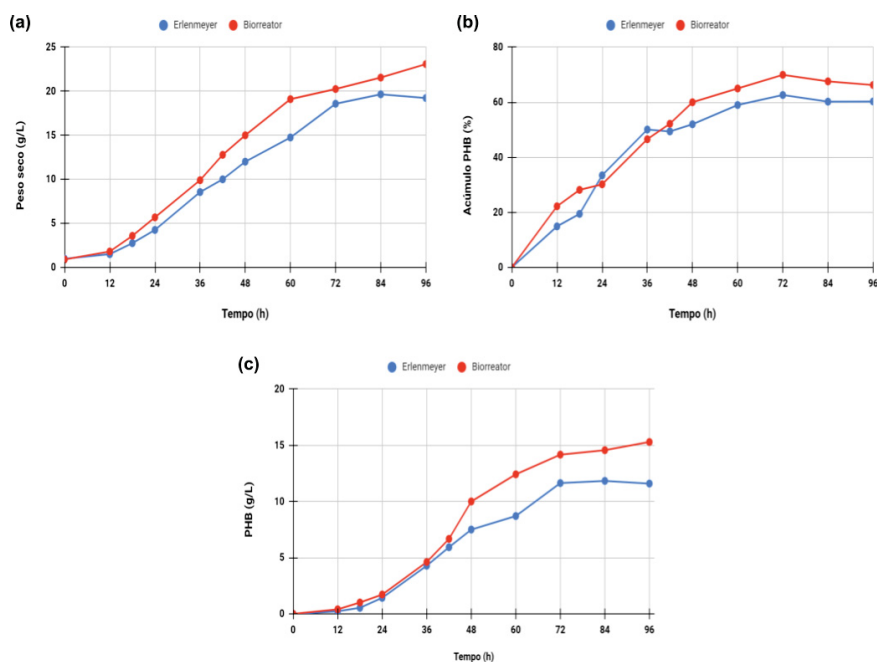


Fonte: A autora (2022)

Durante esse ensaio em biorreator, foi observado um desenvolvimento mais acelerado das respostas analisadas, conforme esperado uma vez que a agitação e aeração promovidas são maiores do que aquelas que ocorrem em *shakers*, o que pode promover um melhor crescimento microbiano (FIGURA 4.10). A maior diferença é observada na produção de PHB (FIGURA 4.10c), a qual apresentou um aumento de cerca de 21% no tempo de 72 horas. A produtividade em termos de PHB também sofreu esse aumento, demonstrando que o microrganismo conseguiu se adaptar bem a uma escala maior, produzindo o metabólito desejado sem dificuldades. Khanna e Srivastava (2005) observaram efeitos similares aos reportados, com um crescimento mais expressivo da biomassa e aumento de 38% na produção de PHB. A produtividade obtida em tal trabalho foi de 0,156 g/Lh de

PHB em 60 horas de processo (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005), enquanto neste trabalho foi atingida uma produtividade de 0,207 g/Lh no mesmo tempo do processo descrito ao longo desta seção, demonstrando assim o potencial do processo desenvolvido com a aplicação de hidrolisado de milho moído e glicerol residual como substratos para a produção do PHB.

FIGURA 4.10 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ENTRE FRASCOS DE ERLIENMEYER E BIORREATOR DE BANCADA COM VOLUME OPERACIONAL DE 8 LITROS EM CINÉTICA DE (a) CRESCIMENTO CELULAR; (b) ACÚMULO DE PHB e (c) PRODUÇÃO DE PHB



Fonte: A autora (2022)

4.3.11. Resultados preliminares de diferentes modos de operação

4.3.11.1. Sacarificação e fermentação simultâneas

A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) é um processo amplamente aplicado na indústria de produção de bioetanol e tem ganhado espaço como um modo de operação para a manufatura de outros bioprodutos, dentre eles o PHB. A principal vantagem deste processo, quando comparado ao tradicional, é a redução do tempo de processo, uma vez que a enzima age ao longo da fermentação, eliminando-se assim o tempo adicional correspondente à segunda etapa de

hidrólise. Na segunda etapa de hidrólise, os oligossacarídeos presentes são hidrolisados, enquanto que os microrganismos consomem os açúcares liberados para crescimento e produção de metabólitos de interesse. Tal método pode ser ideal para a produção de PHB uma vez que a enzima estará constantemente liberando açúcares no meio fermentativo, gerando um possível estresse metabólico para o microrganismo, o que pode contribuir para a produção do biopolímero.

Foram testadas diferentes condições de alimentação da enzima e do inóculo para o teste desse modo de operação, conforme descrito na seção 4.2.11.1. Duas taxas de inóculo (5 e 10% v/v) foram também testadas a fim de avaliar a influência de tal variável no crescimento final do microrganismo. A menor concentração de inóculo inicial foi aplicada com o intuito de equilibrar o consumo de açúcares, uma vez que uma maior taxa de inóculo poderia implicar em uma maior demanda por substrato, o qual não estaria prontamente disponível em algumas das estratégias utilizadas visto que a enzima ainda precisaria agir para a liberação dos açúcares simples para o consumo pelo microrganismo.

Entretanto, é possível observar que a taxa de inóculo inicial foi diretamente proporcional ao crescimento final do microrganismo (TABELA 4.17), não se fazendo necessária esta redução, principalmente devido ao fato de que as primeiras horas de um processo correspondem à fase de adaptação do microrganismo ao meio, para então iniciar o consumo de açúcares e seu desenvolvimento propriamente dito. Além disso, entre as condições A e B, não foram constatadas grandes diferenças nos resultados obtidos. Isso revela, então, que a adição de sais no começo do processo, juntamente com a enzima, não influenciou a ação do catalisador ao longo da fermentação. Contudo, a adição tardia (depois de 12 horas do início do processo) do inóculo implicou em um menor crescimento do microrganismo ao final do processo, fazendo com que as estratégias A e B fossem descartadas para futuros testes.

O ensaio D, na taxa de inóculo de 5%, foi o que apresentou menor desenvolvimento do microrganismo dentre as estratégias estudadas (com 8,58 g/L), além de um maior desvio padrão entre as replicatas (3,85). Apesar de tal estratégia ser aplicada na indústria de bioetanol e ter sido adaptada para a produção de PHB, descartou-se a possibilidade de sua aplicação para futuros testes. A manipulação excessiva do experimento para realizar as alimentações de enzima, sais e inóculo, mesmo realizada em condições estéreis, pode gerar um maior risco de

contaminação. Já a estratégia C, que apresentou resultados promissores para ambas as taxas de inóculo (14,83 e 18,03 g/L para 5 e 10% de inóculo, respectivamente) apresenta um menor risco de contaminação, uma vez que todos os componentes são adicionados no início do processo, sem a necessidade de futuras alimentações, gerando também maior facilidade operacional. Além disso, o resultado obtido na taxa de 10% de inóculo se compara àquele obtido em batelada (18,58 g/L) no mesmo tempo de processo. Isso demonstra a possibilidade de aplicação da SSF para a produção de PHB.

Um contratempo encontrado para todas as estratégias aplicadas foi a concentração de açúcares residuais ao final da fermentação, que variava entre 60 a 94 g/L de glicose no tempo final, além de 6 a 22 g/L de maltose (dados não apresentados). Isso pode significar que a concentração utilizada da glucoamilase, na segunda etapa de hidrólise concomitante à fermentação, pode estar sendo excessiva, gerando mais açúcares redutores do que o microrganismo é capaz de metabolizar durante o tempo da fermentação. Por mais que seja desejável um excesso de fonte de carbono no meio para promover o acúmulo de PHB, uma alta concentração de açúcares residuais ao final do processo pode ser considerada uma desvantagem. Dessa maneira, como perspectiva futura, propõe-se uma otimização desse modo de operação, tendo como variáveis a concentração inicial de enzima e maltose a fim de alcançar uma alta produção de biomassa e acúmulo de PHB com uma baixa concentração de açúcares redutores ao final da fermentação.

TABELA 4.17 – RESULTADOS OBTIDOS NO MODO DE OPERAÇÃO DE SSF COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE INÓCULO E ALIMENTAÇÃO DE ENZIMA

Condição	Biomassa (g/L) com taxa de inóculo 5%	Biomassa (g/L) com taxa de inóculo 10%
A	10,40 ± 0,00	15,95 ± 0,49
B	10,58 ± 2,30	13,98 ± 2,16
C	14,83 ± 1,10	18,03 ± 1,80
D	8,58 ± 3,85	19,05 ± 0,42

4.3.11.2. Batelada alimentada

Para o modo de operação de batelada alimentada, foram testados diferentes tempos para alimentação de fonte de carbono, além do teste da adição de nutrientes (ureia e KH_2PO_4) a fim de avaliar a influência dessas diferentes condições no crescimento microbiano. É possível observar que, quanto mais tarde a alimentação foi realizada para ambos os casos, ocorreu um maior desenvolvimento do microrganismo, o que se deve a um maior acúmulo do biopolímero (Tabela 4.18). Conforme discutido na seção 4.3.9, em 48 horas o acúmulo de PHB começa a entrar em uma taxa de estabilidade. Além disso, há um consumo maior da fonte de carbono nesse tempo. Quando o pulso foi feito em 48 horas, ocorreu um maior crescimento e/ou acúmulo de PHB, quando somente glicose foi alimentada (20,73 g/L), o que representa um aumento de 11% quando comparada à biomassa obtida no mesmo tempo na operação de batelada (18,58 g/L), implicando então que tal modo de operação pode de fato ser vantajoso para a produção de PHB. Outros autores reportam um aumento de 20 a 33% utilizando a batelada alimentada na produção do biopolímero com diferentes estratégias de pulso (único ou em 4 alimentações durante o processo) (LI; WILKINS; 2020). É esperado, assim, que haja um maior acúmulo do biopolímero ao final do processo de batelada alimentada.

Algumas estratégias de alimentação utilizam o meio de cultivo completo, com sais e fonte de nitrogênio, sendo adicionadas ao longo do processo (LI; WILKINS; 2020). Tal condição foi testada, mas os resultados atingidos foram menores do que aqueles obtidos com a glicose como único componente da alimentação (TABELA 4.18). Isso pode acontecer pelo fato de que, com a alimentação de outros nutrientes além da fonte de carbono no meio de cultivo, um balanço melhor entre eles é atingido, não se alcançando então a condição de estresse metabólico necessário para o acúmulo do biopolímero. Dessa maneira, visa-se estudar a alimentação somente da fonte de carbono em estudos futuros, substituindo a solução de glicose comercial pelo hidrolisado de milho moído ou glicerol residual utilizados ao longo do trabalho, avaliando não só o desenvolvimento do microrganismo, mas também o acúmulo e produção de PHB ao longo do tempo de processo. Pretende-se estudar o tempo de alimentação, além de outras estratégias, aplicando-se um pulso único ou vários ao longo da operação, visando maiores rendimentos e produtividades.

TABELA 4.18 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM OPERAÇÃO DE BATELADA ALIMENTADA COM DIFERENTES TEMPOS DE ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO DE GLICOSE

Tempo de alimentação (h)	Biomassa (g/L) em alimentação com sais	Biomassa (g/L) em alimentação sem sais
24	15,08 ± 1,03	18,63 ± 0,25
36	16,05 ± 0,99	19,60 ± 0,92
48	17,75 ± 1,56	20,73 ± 1,24

4.3.12. Resultados preliminares de diferentes modos de extração e da elaboração de biofilmes de PHB

Por se tratar de um produto intracelular, a recuperação de PHB envolve geralmente etapas de rompimento celular, sejam elas do tipo químico, físico ou enzimático. No presente trabalho, foram testados dois métodos descritos na literatura para a obtenção de PHB a partir das células recuperadas do caldo de fermentação utilizando hipoclorito de sódio para digestão da parede celular. O método descrito por Heinrich e colaboradores (2012) utiliza células previamente liofilizadas para a recuperação do biopolímero, enquanto Shin e colaboradores (2021) adaptaram tal protocolo para a digestão das células frescas, logo após o término do período de fermentação (HEINRICH et al., 2012; SHIN et al., 2021).

Para o método de recuperação com as células frescas, um rendimento maior foi obtido (73,60%), mas com pureza menor (73,68%). Já para o método com as células liofilizadas sendo submetidas à digestão, um rendimento de cerca de 70% foi obtido, com uma alta pureza (99%), revelada através da comparação da área do pico do PHB padrão com a área do PHB extraído (FEI et al., 2016) (TABELA 4.19). Os resultados obtidos para este método correspondem àqueles reportados em literatura, visto que Heinrich e colaboradores (2012) obtiveram cerca de 69% de rendimento de um polímero com 99% de pureza, demonstrando a reprodutibilidade do método.

Além disso, é possível observar nas FIGURAS 4.11 e 4.12 que o PHB obtido pelo método de Heinrich possui uma coloração mais branca quando comparado ao

PHB obtido pelo método de Shin, o qual possui uma cor mais branca-amarelada com grânulos maiores. Os biofilmes obtidos dos dois métodos apresentam claras diferenças, com o biofilme derivado do PHB extraído das células frescas com mais grânulos em sua superfície e com uma aparência mais quebradiça. Por sua vez, o biofilme obtido do PHB extraído das células liofilizadas possui uma superfície lisa e maior resistência.

Com os dados apresentados, é possível concluir que o método descrito por Heinrich e colaboradores (2012) possui uma melhor performance na extração do biopolímero quando comparado ao método adaptado por Shin (2021). Isso pode decorrer de dois principais pontos de diferença entre os métodos: o tempo de digestão e o estado celular. A liofilização prévia das células pode ter contribuído para uma ruptura inicial da membrana celular, uma vez que é um processo de choque térmico que foi conduzido sem nenhum criopreservante. Além disso, o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio no protocolo descrito por Heinrich (2012) é de 1 hora, seguido de 8 horas em que o hipoclorito de sódio é dissolvido pela adição de água, mas continua operante. Já no protocolo descrito por Shin (2021), somente a primeira etapa de digestão com hipoclorito de sódio é aplicada, o que pode ter implicado em uma menor pureza do processo.

Apesar do método de Heinrich apresentar melhores resultados, ele possui a desvantagem de um número maior de etapas para a recuperação do biopolímero, o que pode implicar em um maior custo operacional de processo. Além disso, a utilização de hipoclorito de sódio para a extração de PHB não é ideal, uma vez que esse químico pode degradar em parte o biopolímero obtido, reduzindo sua massa molecular e limitando as possibilidades de aplicação (RATNANINGRUM et al., 2020). Dessa maneira, propõe-se não somente otimizar os protocolos estudados durante este trabalho, mas também testar novos métodos de lise celular com enzimas e outros químicos que permitam a recuperação do biopolímero em sua integridade.

TABELA 4.19 – RENDIMENTO E PUREZA OBTIDOS COM DIFERENTES MODOS DE RECUPERAÇÃO DO PHB

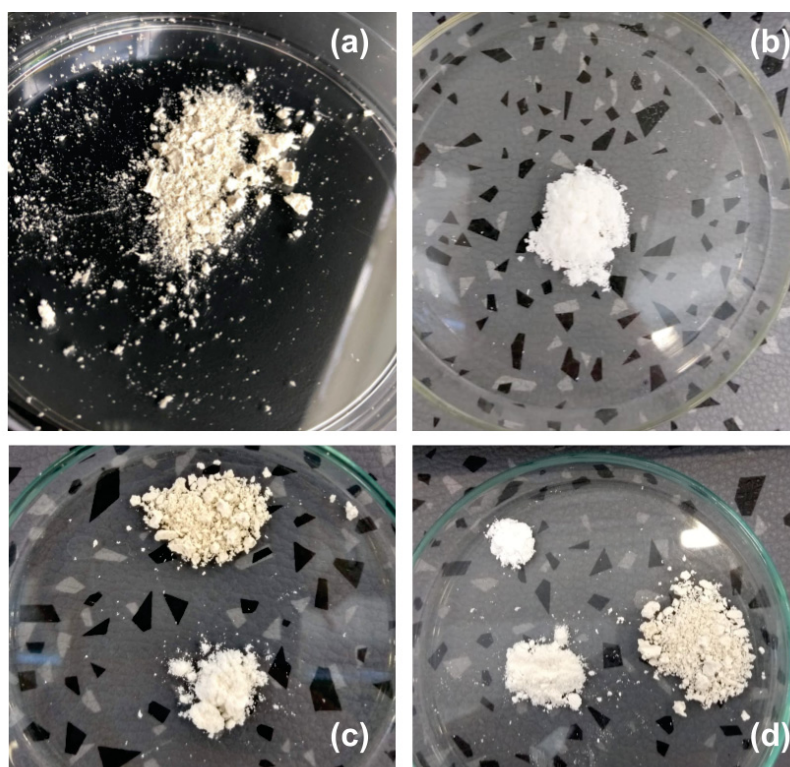
Protocolo testado	Rendimento (%)	Pureza (%)
Células frescas	73,60 ± 7,73	73,68

Células liofilizadas

 $67,16 \pm 4,48$

> 99

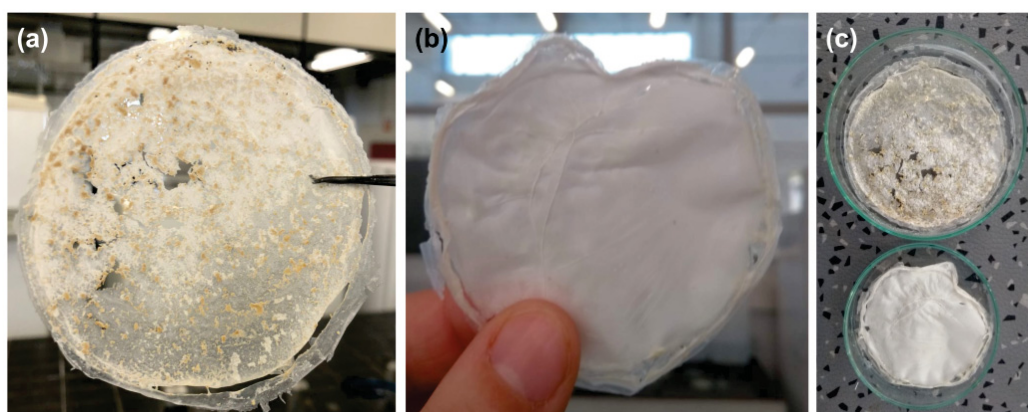
FIGURA 4.11 – COMPARAÇÃO VISUAL DOS DIFERENTES MODOS DE RECUPERAÇÃO DE PHB



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) COM CÉLULAS FRESCAS (b) COM CÉLULAS LIOFILIZADAS (c) COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MODOS (d) COMPARAÇÃO COM O PADRÃO

FIGURA 4.12 – COMPARAÇÃO VISUAL DOS DIFERENTES MODOS DE RECUPERAÇÃO DE PHB APÓS A ELABORAÇÃO DOS BIOFILMES



Fonte: A autora (2022)

LEGENDA: (a) COM CÉLULAS FRESCAS (b) COM CÉLULAS LIOFILIZADAS (c) COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MODOS

4.4. Conclusões

O trabalho desenvolvido validou o uso de produtos agroindustriais para a produção de um biopolímero de alta pureza e alto valor agregado. O hidrolisado da fração amilácea do milho moído, combinado com o glicerol residual, mostrou-se um substrato ideal para o desenvolvimento do microrganismo escolhido para o trabalho e para o acúmulo de PHB. Com as etapas de otimização aplicadas, foi possível aumentar em 119 e 85% o peso seco e a produção de PHB quando comparadas às condições iniciais de cultivo. Em sistema de biorreator, os resultados obtidos se mostram promissores para futuros testes de escalonamento do processo desenvolvido – 20,25 g/L de peso seco, com produtividade correspondente de 0,281 g/Lh, aproximadamente 70% de acúmulo de PHB equivalente à concentração de 14,17 g/L e produtividade de 0,197 g/Lh. O acúmulo máximo reportado durante o trabalho foi de 80% em condições de maior estresse metabólico, valor que pode ser considerado alto para uma cepa não recombinante de *C. necator*, o que reitera a viabilidade de futuro escalonamento.

Além disso, diferentes modos de operação foram testados e validados, atingindo resultados semelhantes ou superiores àqueles reportados nos testes em batelada e em escala de Erlenmeyer (18,03 g/L para SSF, 20,73 para batelada alimentada e 18,58 para o processo original). Demonstra-se, assim, o potencial de desenvolvimento de novos processos baseados no que foi apresentado durante esse trabalho. O biopolímero obtido apresenta elevada pureza (> 99%) e pode ser aplicado em diferentes áreas, tais como as de embalagens (demonstrada pela elaboração dos biofilmes) e farmacêutica. Propõe-se, dessa maneira, a continuidade do trabalho para o desenvolvimento de diferentes modos de operação de maneira otimizada com perspectiva de produção em biorreatores, além da elaboração de um método de extração que apresente bons resultados em termos de rendimento e pureza para futuras aplicações do PHB em áreas com alta demanda.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou o desenvolvimento de processo de produção e recuperação de polihidroxibutirato (PHB) a ser integrado a uma biorrefinaria para a valorização do milho moído. Este produto agroindustrial é amplamente cultivado ao redor do mundo, para a produção de alimentos e biocombustíveis, como o etanol de 1ª geração e o biodiesel, podendo ser explorado para a obtenção de biomoléculas de médio a alto valor agregado. Para tal, realizou-se o estudo da hidrólise ácida e enzimática da fração amilácea do milho moído, estabelecendo-se a hidrólise enzimática como uma melhor alternativa chegando-se a um rendimento de 75%, o que representou 110 g/L de açúcares redutores ao final do processo. Outra alternativa para a hidrólise enzimática foi proposta por meio da simulação do processo de sacarificação e fermentação simultâneas, o que permitiu um rendimento máximo de 92%, demonstrando a viabilidade de aplicação desse modo de operação para produção de PHB e diferentes moléculas de interesse. O uso de hidrolisado enzimático da fração amilácea milho moído e do glicerol residual mostrou-se como uma boa combinação de substratos para a produção de PHB, estabelecendo-se. Após etapas de otimização, a produção de PHB atingiu 11,64 g/L (acúmulo de 62% e 0,162 g/L.h) e 14,17 g/L (70% e 0,197 g/L.h), em frascos de Erlenmeyer e biorreator de 10L, respectivamente. O processo de recuperação do PHB produzido por meio da digestão química com hipoclorito de sódio com células liofilizadas, levou à obtenção de produto de alta pureza (> 99%).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Propõe-se a continuidade deste trabalho com foco no desenvolvimento de novos processos para a obtenção de PHB em diferentes modos de operação e escalas. Dessa maneira, visa-se a utilização da fração lignocelulósica do milho moído para a valorização deste subproduto do processo de hidrólise enzimática da fração amilácea, através do estudo de diferentes métodos de pré-tratamento e da hidrólise enzimática com enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, aplicando tais hidrolisados na produção do PHB. Propõe-se também o estudo dos diferentes modos de operação abordados neste trabalho (batelada alimentada e sacarificação e fermentação simultâneas) com maior profundidade, visando maiores rendimentos e produtividades quando comparado ao processo em batelada. Além disso, é visado o escalonamento do processo para a escala piloto.

No âmbito da recuperação do bioproduto, propõe-se a comparação de uma maior gama de métodos de extração de PHB, utilizando-se de métodos químicos clássicos (como extração com clorofórmio) e enzimático, estudando o rendimento e pureza obtidos em cada uma das diferentes metodologias e realizando a caracterização do PHB obtido, assim como de seu biofilme, com diferentes técnicas analíticas (Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, Microscopia Eletrônica de Varredura, FTIR, Raio X, Espectroscopia NMR, entre outros). O melhor método de extração poderá ser aplicado para a recuperação com alto rendimento do PHB, o qual por sua vez, poderá ser aplicado em diferentes áreas, mas com foco no desenvolvimento de nanopartículas para sistemas de entrega controlada de fármacos.

7. REFERÊNCIAS

ABDUS-SALAAM, R. B.; ADEPOJU, P. A.; OLALEYE, O. N.; ADEOYE, I. A. Studies on the antimicrobial effect of corn steep liquor on some diarrhoea causing organisms. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 332–335, 2014.

ADELEYE, A. T.; ODOH, C. K.; ENUDI, O. C.; et al. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. **Process Biochemistry**, v. 96, n. March, p. 174–193, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>>.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Flame Atomic Absorption Spectroscopy**. 2021.

AHN, J.; JHO, E. H.; NAM, K. Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. **Environmental Engineering Research**, v. 20, n. 3, p. 246–253, 2015.

AKAO, S.; NAGARE, H.; MAEDA, M.; KONDO, K.; FUJIWARA, T. Non-sterile simultaneous saccharification and fermentation of corn leaves and stalks to l-lactic acid without external nutrient addition. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 18, n. 2, p. 208–214, 2016. Springer Japan.

ALCÂNTARA, J. M. G.; DISTANTE, F.; STORTI, G.; et al. Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology Advances**, v. 42, n. April, p. 107582, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107582>>.

ALMEIDA, R. L. J.; DOS SANTOS PEREIRA, T.; DE ANDRADE FREIRE, V.; et al. Influence of enzymatic hydrolysis on the properties of red rice starch. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 141, p. 1210–1219, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.072>>.

ALVES, A. A.; SIQUEIRA, E. C.; BARROS, M. P. S.; SILVA, P. E. C.; HOULLOU, L. M. Polyhydroxyalkanoates: a review of microbial production and technology application. **International Journal of Environmental Science and Technology**, , n. 0123456789, 2022. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13762-022-04213-9>>.

AMACHE, R.; SUKAN, A.; SAFARI, M.; ROY, I.; KESHAVARZ, T. Advances in PHAs production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 931–936, 2013.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 3, p. 179–186, 2009.

AMINI, M.; YOUSEFI-MASSUMABAD, H.; YOUNESI, H.; ABYAR, H.; BAHRAMIFAR, N. Production of the polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Cupriavidus necator* using beer brewery wastewater containing maltose as a primary carbon source. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 103588, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103588>>.

ARAMVASH, A.; AKBARI SHAHABI, Z.; DASHTI AGHJEH, S.; GHAFARI, M. D. Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 7, p. 2307–2316, 2015. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>>.

ARUMUGAM, A.; ANUDAKSHAINI, T. S.; SHRUTHI, R.; et al. Low-cost production of PHA using cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice as potential substrate: optimization and characterization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 4, p. 1167–1178, 2020. Biomass Conversion and Biorefinery.

ARUMUGAM, A.; SENTHAMIZHAN, S. G.; PONNUSAMI, V.; SUDALAI, S. Production and optimization of polyhydroxyalkanoates from non-edible *Calophyllum inophyllum* oil using *Cupriavidus necator*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 598–607, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.012>>.

ASSIS, D. D. J.; DRUZIAN, J. I.; SOUSA, L. S.; CAMPOS, M. I.; RIBEIRO, P. L. L. Estabelecimento de parâmetros para obtenção de polihidroxialcanoato de alta massa molecular e baixo grau de cristalinidade a partir da glicerina bruta. **INPI**, 2018. Brasil.

AVRELLA, E. D.; PAIM, L. P.; EMER, A. A.; VENCE, L. B.; FIOR, C. S. Method for the physical characterization of substrates using centrifugation. **Scientia Agricola**, v. 79, n. 5, p. 1–10, 2022.

AZELEE, N. I. W.; RAMLI, A. N. M.; MANAS, N. H. A.; et al. Glycerol in food, cosmetics and pharmaceutical industries: Basics and new applications. **International Journal of Scientific and Technology Research**, v. 8, n. 12, p. 553–558, 2019.

BARNHARST, T.; SUN, X.; RAJENDRAN, A.; et al. Enhanced protein and amino acids of corn–ethanol co-product by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 9, p. 1989–2000, 2021.

BARROS, S.; WOODY, K. **Corn Ethanol Production Booms in Brazil**. 2020.

BELYEA, R. L.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESON, M. E. Composition of corn and distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 293–298, 2004.

BENASSI, V. M.; PASIN, T. M.; FACCHINI, F. D. A.; JORGE, J. A.; DE MORAES POLIZELI, M. DE L. T. A novel glucoamylase activated by manganese and calcium produced in submerged fermentation by *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 333–339, 2014.

BHOLA, S.; ARORA, K.; KULSHRESTHA, S.; et al. Established and Emerging Producers of PHA: Redefining the Possibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 11, p. 3812–3854, 2021. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-021-03626-5>>.

BIJTTEBIER, A.; GOESAERT, H.; DELCOUR, J. A. Amylase action pattern on starch polymers. **Biologia**, v. 63, n. 6, p. 989–999, 2008.

BIOPLASTICS MAGAZINE. LG Chem teams up with TK Chemical to produce biodegradable plastics. Disponível em: <<https://www.bioplasticsmagazine.com/en/news/meldungen/20210913-LG-Chem-teams-up-with-TK-Chemical-to-produce-biodegradable-plastics.php>>. Acesso em: 7/9/2022.

BITTENCOURT, G. A.; VANDENBERGHE, L. P. DE S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; SOCCOL, C. R. Soybean hull valorization for sugar production through the optimization of citric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 186, n. May, p. 115178, 2022. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115178>>.

BRÖRING, S.; LAIBACH, N.; WUSTMANS, M. Innovation types in the bioeconomy. **Journal of Cleaner Production**, v. 266, p. 121939, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652620319867>>.

CAMPOS, M. I.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; DRUZIAN, J. I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 338–346, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.008>>.

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; DE ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFILS, C.; DA FONSECA, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 509–515, 2009

CHEN, J.; DAVIS, S. S. The release of diazepam from poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 2, p. 191–201, 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652040110065431>>.

CHOHAN, N. A.; ARUWAJOYE, G. S.; SEWSYNKER-SUKAI, Y.; GUEGUIM KANA, E. B. Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: Process optimization and kinetic assessment. **Renewable Energy**, v. 146, p. 1031–1040, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.042>>.

CORN REFINERS ASSOCIATION. Advanced Biomaterials. Disponível em: <<https://corn.org/products/advanced-bioproducts/>>. Acesso em: 7/9/2022. CORN REFINERS ASSOCIATION. Advanced bioproducts. Disponível em: <<https://corn.org/products/advanced-bioproducts/>>.

DAHMAN, Y.; UGWU, C. U. Production of green biodegradable plastics of poly(3-hydroxybutyrate) from renewable resources of agricultural residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1561–1568, 2014.

DALSASSO, R. R.; PAVAN, F. A.; BORDIGNON, S. E.; ARAGÃO, G. M. F. DE; POLETTO, P. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. **Process Biochemistry**, v. 85, n. May, p. 12–18, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>>.

DE GISI, S.; GADALETA, G.; GORRASI, G.; et al. The role of (bio)degradability on the management of petrochemical and bio-based plastic waste. **Journal of Environmental Management**, v. 310, n. February, p. 114769, 2022. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114769>>.

DE VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a

sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 46–52, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.083>>.

DEVOS, R. J. B.; COLLA, L. M. Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol: A bibliometric and systematic study. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, n. December 2021, p. 100924, 2022. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100924>>.

DHAKA, V.; SINGH, S.; ANIL, A. G.; et al. Occurrence, toxicity and remediation of polyethylene terephthalate plastics. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 1777–1800, 2022. Springer International Publishing. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-021-01384-8>>.

DHAR, N. R. The Starch-Iodine Reaction. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 125–130, 1924. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j150236a002>>.

DIETRICH, K.; DUMONT, M. J.; DEL RIO, L. F.; ORSAT, V. Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. **Sustainable Production and Consumption**, v. 9, n. September 2016, p. 58–70, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>>.

DOBROGOJSKI, J.; SPYCHALSKI, M.; LUCIŃSKI, R.; BOREK, S. Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 9, p. 1–17, 2018. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4>>.

DOS SANTOS, A. A.; DEOTI, R.; MÜLLER, G.; et al. Dosagem de açúcares redutores com o reagente DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

DRURY, S. M.; REYNOLDS, T. L.; RIDLEY, W. P.; et al. Composition of Forage and Grain from Second-Generation Insect-Protected Corn MON 89034 Is Equivalent to That of Conventional Corn (*Zea mays* L.). **Journal of Agricultural and Food**

Chemistry, v. 56, n. 12, p. 4623–4630, 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf800011u>>.

DU, C.; LI, Y.; ZONG, H.; et al. Production of bioethanol and xylitol from non-detoxified corn cob via a two-stage fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 310, n. March, p. 123427, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123427>>.

DUCAT, D. C.; OSTERYOUNG, K.; MACCREADY, J. S. Genetic control of cell size. **US Patent Office**, 2018. EUA.

ELSAYED, N. S.; MOHAMED ABOSHANAB, K.; ABOULWAFI, M.; ABDELHALEEM HASSOUNA, N. COST-EFFECTIVE PRODUCTION OF THE BIO-PLASTIC POLY- β -HYDROXYBUTYRATE USING ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLATE P39. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 5, n. 6, p. 552–556, 2016. Disponível em: <<https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/8463>>.

EUROPEAN BIOPLASTICS. Bioplastics market data update. Disponível em: <<https://www.european-bioplastics.org/market/>>. Acesso em: 7/9/2022.

FARAH, S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 367–392, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>>.

FAVA, M. Ocean plastic pollution an overview: data and statistics. Disponível em: <<https://oceanliteracy.unesco.org/plastic-pollution-ocean/>>. Acesso em: 7/9/2022

FEI, T.; CAZENEUVE, S.; WEN, Z.; WU, L.; WANG, T. Effective recovery of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. **Biotechnology progress**, v. 32, n. 3, p. 678–685, 2016.

FIGLIANO, M. L.; FREITAS, F.; PAIS, J.; et al. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 6, p. 454–461, 2009.

GAHLAWAT, G.; KUMAR SONI, S. Study on sustainable recovery and extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by *Cupriavidus necator* using waste glycerol for medical applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 33, n. 1, p. 99–110, 2019.

GAMAL, R. F.; ABDELHADY, H. M.; KHODAIR, T. A.; et al. Semi-scale production of PHAs from waste frying oil by *Pseudomonas fluorescens* S48. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 539–549, 2013.

GANESAN, R.; MANIGANDAN, S.; SHANMUGAM, S.; et al. A detailed scrutinize on panorama of catalysts in biodiesel synthesis. **Science of the Total Environment**, v. 777, p. 145683, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145683>>.

GARCÍA, I. L.; LÓPEZ, J. A.; DORADO, M. P.; et al. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 16–22, 2013.

GARCÍA-TORREIRO, M.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A.; LEMA, J. M. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by simultaneous saccharification and fermentation of cereal mash using *Halomonas boliviensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 140–146, 2016a. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.002>>.

GARCÍA-TORREIRO, M.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LÚ CHAU, T. A.; LEMA RODICIO, J. M. Procedimiento para la producción de polihidroxicanoatos y de ectoína mediante sacarificación y fermentación simultánea a partir de hidrolizados de grano de cereal. **OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCA**, 2016b. Espanha.

GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 81–86, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.012>>.

GONZALEZ, K.; NAVIA, R.; LIU, S.; CEA, M. Biological Approaches in Polyhydroxyalkanoates Recovery. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1–10, 2021. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02263-1>>.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 201–207, 2001

GRAND VIEW RESEARCH. Glycerol Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source (Biodiesel, Fatty Alcohol, Fatty Acids, Soaps), By Type (Crude, Refined), By End Use, By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2027. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/glycerol-market>>. Acesso em: 7/9/2022

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 580–605, 2013

GUO, W.; YANG, K.; QIN, X.; et al. Polyhydroxyalkanoates in tissue repair and regeneration. **Engineered Regeneration**, v. 3, n. 1, p. 24–40, 2022. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.01.003>>.

HAGHIGHI MOOD, S.; HOSSEIN GOLFESHAN, A.; TABATABAEI, M.; et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013

HALL, J.; ZUMDAHL, S. S. **Experimental Chemistry NINTH EDITION**. 2014

HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; et al. **Preparation of Samples for Compositional Analysis: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 08/08/2008**. 2008

HARUN, Z.; ARSAD, A.; PANG, A. L.; et al. Acid Hydrolysis and Optimization Techniques for Nanoparticles Preparation: Current Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 3779–3801, 2022. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-022-03932-6>>.

HASSAN, A. B.; PAWELZIK, E.; VON HOERSTEN, D. Effect of microwave heating on the physiochemical characteristics, colour and pasting properties of corn (*Zea mays* L.) grain. **Lwt**, v. 138, n. April 2020, p. 110703, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110703>>.

HEINRICH, D.; MADKOUR, M. H.; AL-GHAMDI, M. A.; SHABBAJ, I. I.; STEINBÜCHEL, A. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2012.

HU, W.; LIU, J.; CHEN, J. HONG; et al. A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 15, n. 11, p. 1006–1010, 2014.

HUANG, L.; TAN, H.; ZHANG, C.; LI, Q.; LIU, Q. Starch biosynthesis in cereal endosperms: An updated review over the last decade. **Plant Communications**, v. 2, n. 5, p. 100237, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100237>>.

IENCZAK, J. L.; SCHMIDELL, W.; DE ARAGÃO, G. M. F. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: A review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3–4, p. 275–286, 2013.

INDEX MUNDI. Corn Production by Country in 1000 MT. Disponível em: <<https://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=corn>>. Acesso em: 7/9/2022.

INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. Plástico biodegradável de açúcar não consegue chegar ao mercado. Disponível em: <<https://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=plastico-biodegradavel-acucar&id=010175120807#.YxjBbDVv9PZ>>. Acesso em: 7/9/2022.

JUNG, H. IL; LEE, O. M.; JEONG, J. H.; et al. Production and characterization of cellulose by acetobacter sp. V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 486–497, 2010.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, n. 1, p. 79–86, 2004.

KALIA, V. C.; RAY, S.; PATEL, S. K. S.; SINGH, M.; SINGH, G. P. **The dawn of novel biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates**. 2019.

KALIA, V. C.; SINGH PATEL, S. K.; SHANMUGAM, R.; LEE, J. K. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 326, n. November 2020, p. 124737, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124737>>.

KARP, S. G.; MEDINA, J. D. C.; LETTI, L. A. J.; et al. Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 3, p. 899–912, 2021

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 321–326, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>>.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2173–2182, 2005

KIBEOM, L.; SANG KEE, K.; YUN, J. C. A low-cost *Lactobacillus salivarius* L29 growth medium containing molasses and corn steep liquor allows the attainment of high levels of cell mass and lactic acid production. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 16, p. 2013–2018, 2013

KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 10, p. 774–777, 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022900002994>>.

KLEINHANS, G. B.; PRITCHARD, R. H.; HOLT, S. M. Composition and Nutritive Value of Corn Fractions and Ethanol Co-products Resulting from a New Dry-milling Process 1. **South Dakota Beef Report**, 2005

KOLLER, M. A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. **Fermentation**, v. 4, n. 2, 2018

KOLLER, M. Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production, Volume 3. **Bioengineering**, v. 9, n. 7, p. 328, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-5354/9/7/328>>.

KOLLER, M.; NIEBELSCHÜTZ, H.; BRAUNEGG, G. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 6, p. 549–562, 2013

KOREA CERTIFICATION. Chemical companies work on environmentally friendly "green" plastics. Chemical companies work on environmentally friendly "green" plastics. Disponível em: <<https://www.korea-certification.com/en/chemical-companies-work-on-environmentally-friendly-green-plastics/>>. Acesso em: 7/9/2022.

KOURMENTZA, C.; PLÁCIDO, J.; VENETSANEAS, N.; et al. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 1–43, 2017.

KUCERA, D.; BENESOVA, P.; LADICKY, P.; et al. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolyzates of spruce sawdust: Comparison of hydrolyzates detoxification by application of overliming, active carbon, and lignite.

Bioengineering, v. 4, n. 2, 2017.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240–245, 2009. The Society for Biotechnology, Japan. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.006>>.

KUMAR, A.; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>>.

KUMAR, P.; KIM, B. S. Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 269, n. August, p. 544–556, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>>.

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.

LAW, K. L. Plastics in the Marine Environment. **Annual Review of Marine Science**, v. 9, n. 1, p. 205–229, 2017.

LAWFORD, H. G. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zygomonas* ethanol fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 63–65, n. 1, p. 287–304, 1997.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in**

Polymer Science, v. 38, n. 3–4, p. 536–583, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003>>.

LAZZAROTTI, F.; DALFOVO, M. S.; HOFFMANN, V. E. A Bibliometric Study of Innovation Based on Schumpeter. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 6, n. 4, p. 121–135, 2011. Disponível em: <<http://www.jotmi.org>>.

LEE, P. C.; LEE, S. Y.; HONG, S. H.; CHANG, H. N. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 1, p. 63–67, 2003.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138–145, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148112001863>>.

LI, J.; YANG, Z.; ZHANG, K.; et al. Valorizing waste liquor from dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass by *Bacillus megaterium* B-10. **Industrial Crops and Products**, v. 161, n. 932, p. 113160, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113160>>.

LI, M.; WILKINS, M. Fed-batch cultivation and adding supplements to increase yields of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* from corn stover alkaline pretreatment liquor. **Bioresource Technology**, v. 299, n. October 2019, p. 122676, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122676>>.

LI, X.; CHEN, S.; YU, Y.; et al. Ethanol production from mixtures of Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS) and corn. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 59–66, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669018310501>>.

LI, Z.; YAN, J.; SUN, J.; et al. Production of value-added chemicals from glycerol using in vitro enzymatic cascades. **Communications Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2018. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42004-018-0070-7>>.

LUO, C. B.; LI, H. C.; LI, D. Q.; et al. Efficiently unsterile polyhydroxyalkanoate production from lignocellulose by using alkali-halophilic *Halomonas alkalicola* M2. **Bioresource Technology**, v. 351, n. February, p. 126919, 2022. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126919>>.

LUO, X.; GE, X.; CUI, S.; LI, Y. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 144–154, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.042>>.

MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. F. Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism in Washed Suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*.pdf. **J . gen. Microbiol**, p. 210–222, 1958

MADKOUR, M. H.; HEINRICH, D.; ALGHAMDI, M. A.; SHABBAJ, I. I.; STEINBÜCHEL, A. PHA recovery from biomass. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 2963–2972, 2013

MAILLOUX, R. J. Still at the Center of it All; Novel Functions of the Oxidative Krebs Cycle. **Bioenergetics: Open Access**, v. 04, n. 01, p. 1–14, 2015. MANANDHAR, A.; SHAH, A. Techno-Economic Analysis of Bio-Based Lactic Acid. **Processes**, v. 199, p. 8, 2020

MARGONO; NURCAHYANTO, M.; ROCHMADI; SYAMSIAH, S. Making polyhydroxybutyrate involves fermenting tapioca starch; providing additional feed stock and carrying out fermentation; carrying out further fermentation with feed composition of tapioca starch and ammonium sulfate; and harvesting. **Indonesian Patent Office**, 2013. Indonesia.

MARKETS AND MARKETS. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type (Short chain length, Medium Chain Length), Production Methods (Sugar Fermentation,

Vegetable Oil Fermentation), Application (Packaging & Food Services, Biomedical) and Region - Global Forecast to 2027. **Markets and Markets**, p. 9–14, 2022. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html>>.

MARKL, E. PHB - Bio Based and Biodegradable Replacement for PP: A Review. **Novel Techniques in Nutrition & Food Science**, v. 2, n. 5, p. 206–209, 2018.

MARTINS-PINHEIRO, M.; LIMA, W. C.; ASIF, H.; OLLER, C. A.; MENCK, C. F. M. Evolutionary and functional relationships of the dha regulon by genomic context analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–13, 2016.

MIAO, M.; LI, R.; HUANG, C.; JIANG, B.; ZHANG, T. Impact of β -amylase degradation on properties of sugary maize soluble starch particles. **Food Chemistry**, v. 177, p. 1–7, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.101>>.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORGAN-SAGASTUME, F.; HJORT, M.; CIRNE, D.; et al. Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 78–89, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.046>>.

MOSER, B. R.; VAUGHN, S. F. Biodiesel from Corn Distillers Dried Grains with Solubles: Preparation, Evaluation, and Properties. **Bioenergy Research**, v. 5, n. 2, p. 439–449, 2012.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J. U. Production of PHB from crude glycerol. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 5, p. 475–479, 2007.

MOZUMDER, M. S. I.; DE WEVER, H.; VOLCKE, E. I. P.; GARCIA-GONZALEZ, L. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal

polyhydroxybutyrate production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 365–373, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.004>>.

MUHAMMADI; SHABINA; AFZAL, M.; HAMEED, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 8, n. 3–4, p. 56–77, 2015. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17518253.2015.1109715>>.

MUNEER, F.; RASUL, I.; AZEEM, F.; et al. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 9, p. 2301–2323, 2020. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1>>.

MUTHURAJ, R.; VALERIO, O.; MEKONNEN, T. H. Recent developments in short- and medium-chain- length Polyhydroxyalkanoates: Production, properties, and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, n. April, p. 422–440, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.143>>.

NASCIMENTO, J. F.; PACHEKOSKI, W. M.; AGNELLI, J. A. M. Environmentally degradable polymeric blend and process for obtaining an environmentally degradable polymeric blend. **WIPO**, 2007. Brasil.

NASCIMENTO, V. M.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; FONSECA, G. G. Growth of burkholderia sacchari LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 5, p. 429–433, 2016.

NASER, A. Z.; DEIAB, I.; DARRAS, B. M. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 28, p. 17151–17196, 2021. Royal Society of Chemistry.

NICOLETTI, GIOVANNI; ARCURI, N.; NICOLETTI, GERARDO; BRUNO, R. A technical and environmental comparison between hydrogen and some fossil fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 89, p. 205–213, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2014.09.057>>.

NIKOLIĆ, S.; MOJOVIĆ, L.; RAKIN, M.; PEJIN, D.; PEJIN, J. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 216–222, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.063>>.

NOMANBHAY, S.; HUSSEIN, R.; ONG, M. Y. Sustainability of biodiesel production in Malaysia by production of bio-oil from crude glycerol using microwave pyrolysis: A review. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 11, n. 2, p. 135–157, 2018.

NURFARAHIN, A. H.; MOHAMED, M. S.; PHANG, L. Y. Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1–26, 2018.

O'CONNOR, K.; GUZIK, M.; PADAMATI, R.; KENNY, S. Method for converting polyethylene to biodegradable polyhydroxyalkanoate. **European Patents OfficeOffice**, 2014. Irlanda.

ODJO, S.; BÉRA, F.; BECKERS, Y.; FOUCART, G.; MALUMBA, P. Influence of variety, harvesting date and drying temperature on the composition and the in vitro digestibility of corn grain. **Journal of Cereal Science**, v. 79, p. 218–225, 2018.

OECD. **Global Plastics Outlook**. 2022.

OWENS, F. Corn grain processing and digestion. **Pioneer Hi-Bred International**, p. 1–21, 2015. PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnologia do grão de milho. Circular Técnica. **Embrapa/Cnpms**, , n. 75, p. 1–6, 2006.

PALMEIRO-SÁNCHEZ, T.; O'FLAHERTY, V.; LENS, P. N. L. Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future. **Journal of Biotechnology**, v. 348, n. February, p. 10–25, 2022.

PAN, W.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NOMURA, C. T.; NAKAS, J. P. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 459–469, 2012.

PAQUES BIOMATERIALS. UPCYCLING WASTE TO NATURAL BIOPOLYMERS
Natural biopolymers produced from. Disponível em:
<<https://www.paquesbiomaterials.nl/>>. Acesso em: 7/9/2022.

PARVEEZ, G. K. A.; RASID, O. A.; HASHIM, A. T.; et al. **Tissue Culture and Genetic Engineering of Oil Palm**. AOCS Press, 2012.

PASSANHA, P.; ESTEVES, S. R.; KEDIA, G.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 345–352, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.050>>.

PECKA-KIELB, E.; ZACHWIEJA, A.; MISTA, D.; ZAWADZKI, W.; ZIELAK-STECIWKO, A. Use of Corn Dried Distillers Grains (DDGS) in Feeding of Ruminants. **Frontiers in Bioenergy and Biofuels**, 2017.

PETROBRAS. Refino. Disponível em:
<<https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/refino/>>. Acesso em: 7/9/2022.

PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 233–247, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.1667>>.

PLEISSNER, D.; DEMICHELIS, F.; MARIANO, S.; et al. Direct production of lactic acid based on simultaneous saccharification and fermentation of mixed restaurant food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 615–623, 2017.

POLI, A.; DI DONATO, P.; ABBAMONDI, G. R.; NICOLAUS, B. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Archaea**, v. 2011, p. 1–13, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/archaea/2011/693253/>>.

POOMIPUK, N.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Poly- β -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus* sp. KCU38. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 51–64, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.002>>.

PRADELLA, J. G. DA C.; IENCZAK, J. L.; DELGADO, C. R.; TACIRO, M. K. Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using *Cupriavidus necator*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 6, p. 1003–1007, 2012.

PRATIWI, M.; FARIDAH, D. N.; LIOE, H. N. Structural changes to starch after acid hydrolysis, debranching, autoclaving-cooling cycles, and heat moisture treatment (HMT): A review. **Starch/Staerke**, v. 70, n. 1–2, 2018.

PRIYADARSHI, S.; SHUKLA, A.; BORSE, B. B. Polyhydroxyalkanoates: Role of *Ralstonia eutropha*. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 5, n. 2, p. 68, 2014. Disponível em: <www.ss-journals.com>.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; MOK, C.; OBULAM, V. S. R. A review of recent advances in high gravity ethanol fermentation. **Renewable Energy**, v. 133, p. 1366–1379, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.062>>.

RAHMAN, A.; LINTON, E.; HATCH, A. D.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D. Secretion of polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach. **Journal of Biological Engineering**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2013.

RAMOS, M. D. N.; MILESSI, T. S.; CANDIDO, R. G.; MENDES, A. A.; AGUIAR, A. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**, v. 68, p. 103–119, 2022.

RATHI, D. N.; AMIR, H. G.; ABED, R. M. M.; et al. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simplified polymer recovery by a novel moderately halophilic bacterium isolated from hypersaline microbial mats. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 384–395, 2013.

RATHNA, G. V. N.; BHAGYASHRI, S.; GADGIL, T.; KILLI, N. Polyhydroxyalkanoates: The application of eco-friendly materials. **Biodegradable and Biobased Polymers for Environmental and Biomedical Applications**, p. 25–54, 2016.

RATHORE, P. Bioprospects of PHB : A Review. **International Journal of Emerging Trends in Science and Technology**, v. 1, n. 4, p. 529–532, 2014.

RATNANINGRUM, D.; ENDAH, E. S.; SARASWATY, V.; et al. The effect of sodium hypochlorite concentration on extraction of poly- β -hydroxy-butyrate (PHB) produced from soil bacteria *Burkholderia* sp B37. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 483, n. 1, 2020.

RAZA, Z.; RIAZ, S.; BANAT, I. Chemical modification of polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 1, p. 29–41, 2017.

RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, n. January 2017, p. 45–56, 2018.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Annual World Fuel Ethanol Production (Mil. Gal.). Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>>. Acesso em: 7/9/2022. 2022a

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **2022 Ethanol Industry Outlook**. 2022b.

RIEDEL, S. L.; JAHNS, S.; KOENIG, S.; et al. Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 119–127, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.002>>.

ROBYT, J. F. **Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology**. 2008.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A.; KOLLER, M.; MIRANDA-DE SOUSA DIAS, M.; et al. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50–57, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.007>>.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197–207, 2006.

ROSENBOOM, J. G.; LANGER, R.; TRAVERSO, G. Bioplastics for a circular economy. **Nature Reviews Materials**, v. 7, n. 2, p. 117–137, 2022. Springer US.

SABAPATHY, P. C.; DEVARAJ, S.; MEIXNER, K.; et al. Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. **Bioresource Technology**, v. 306, n. March, p. 123132, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>>.

SABIROVA, J.; ABRAHAM, W.-R.; GOLYSHIN, P.; et al. Extracellular polyhydroxyalkanoates produced by genetically engineered microorganisms. **European Patents Office**, 2007. Alemanha.

SALEHIZADEH, H.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 261–279, 2004.

SANTIBÁÑEZ, C.; VARNERO, M. T.; BUSTAMANTE, M. Residual glycerol from biodiesel Manufacturing, waste or potential source of Bioenergy: A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. 3, p. 469–475, 2011.

SANTOS, D. A.; WINTER, E.; BEZERRA, M.; JUNIOR, D. S. Panorâmica Atual da Tecnologia Verde de Gaseificação no Brasil: Uma Abordagem Via Documentação Patentária Current overview of Green Gasification Technology in Brazil: An Approach Via- patent documentation. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, p. 98–110, 2014.

SARATALE, G. D.; OH, M. K. Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 627–635, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.034>>.

SARMIENTO-VÁSQUEZ, Z.; VANDENBERGHE, L. P. DE S.; KARP, S. G.; SOCCOL, C. R. Production of Polyhydroxyalkanoates through Soybean Hull and Waste Glycerol Valorization: Subsequent Alkaline Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis. **Fermentation**, v. 8, n. 9, p. 433, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2311-5637/8/9/433>>.

SCHWEINBERGER, C. M.; TRIERWEILER, J. O.; TRIERWEILER, L. F. A simple equation for Total Reducing Sugars (TRS) estimation on sweet potato and ethanol yield potential. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 33–41, 2019.

SCHWIETZKE, S.; KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N.; LADISCH, M. Ethanol production from maize. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 63, p. 347–364, 2009.

SEHGAL, R.; GUPTA, R. Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development. **3 Biotech**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2020. Springer International Publishing. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02550-5>>.

SHIN, G.; JEONG, D. W.; KIM, H.; et al. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate with cellulose nanocrystals using *Cupriavidus necator*. **Polymers**, v. 13, n. 16, p. 1–8, 2021.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state fermentation for the production of Poly(hydroxyalkanoates). **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 173–181, 2015.

SIROHI, R.; PANDEY, J. P.; GOEL, R.; et al. Two-Stage Enzymatic Hydrolysis for Fermentable Sugars Production from Damaged Wheat Grain Starch with Sequential Process Optimization and Reaction Kinetics. **Starch/Staerke**, v. 73, n. 1–2, p. 1–9, 2021.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; et al. **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples**. 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; et al. **Determination of Ash in Biomass**. 2008b.

SMITH, M. E.; MORTON, D. G. Digestion and Absorption. **The Digestive System**, p. 129–152, 2010.

SOOD, S.; SINGHAL, R.; BHAT, S.; KUMAR, A. **Inoculum Preparation**. Second Edition ed. Elsevier B.V., 2011.

STATISTA. Leading soybean producing countries worldwide from 2012/13 to 2021/22. Disponível em:

<<https://www.statista.com/statistics/263926/soybean-production-in-selected-countries-since-1980/>>. Acesso em: 7/9/2022.

STRAATHOF, A. J. J. **The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes**. Second Edition ed. Elsevier B.V., 2011.

TAGUCHI, S.; DOI, Y. Evolution of Polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “enzyme evolution”: Successful case studies of directed evolution. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 3, p. 145–156, 2004.

TAGUCHI, S.; MATSUMOTO, K. Evolution of polyhydroxyalkanoate synthesizing systems toward a sustainable plastic industry. **Polymer Journal**, v. 53, n. 1, p. 67–79, 2021. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41428-020-00420-8>>.

TAN, D.; YIN, J.; CHEN, G. Q. **Production of Polyhydroxyalkanoates**. Elsevier B.V., 2016.

TAN, G. Y. A.; CHEN, C. L.; LI, L.; et al. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. **Polymers**, v. 6, n. 3, p. 706–754, 2014.

TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE, S.; et al. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 211–217, 2006.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Polyhydroxyalkanoate Market Sustainable Value Chains Ride Crest of Popularity During Coronavirus Crisis Pseudomonas Strains Gaining Prominence for Using Waste Oils in PHA Production PHA Hold Promising Potentials in Production of Biodegradable Plastics Pol. Disponível em: <<https://www.transparencymarketresearch.com/polyhydroxyalkanoate-market.html>>. Acesso em: 7/9/2022.

TU, W.; ZHANG, D.; WANG, H. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge by mixed microbial cultures: The link between

phosphorus and PHA yields. **Waste Management**, v. 96, p. 149–157, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.021>>.

TURINI, C. DA S.; NOGUEIRA, R. M.; PIRES, E. M.; AGOSTINI, J. DA S. Enzymatic hydrolysis of carbohydrates in by-products of processed rice. **Ciencia Rural**, v. 51, n. 11, 2021.

TURNER, A.; FILELLA, M. Hazardous metal additives in plastics and their environmental impacts. **Environment International**, v. 156, p. 106622, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106622>>.

UDOP. União Nacional da Bioenergia Diversas UNEM : Produção de etanol de milho chega a 4 , 5 bilhões de litros e eleva participação para 15 % do mercado nacional. Disponível em: <<https://www.udop.com.br/noticia/2022/05/03/unem-producao-de-etanol-de-milho-chega-a-4-5-bilhoes-de-litros-e-eleva-participacao-para-15-do-mercado-nacional.html>>. Acesso em: 7/9/2022.

UNICA. SUGARCANE SECTOR SUSTAINABLE FOOD AND ENERGY. Disponível em: <<https://unica.com.br/en/sugarcane-sector/>>. Acesso em: 7/9/2022.

VANDENBERGHE, L. P. DE S.; OLIVEIRA, P. Z. DE; BITTENCOURT, G. A.; et al. The 2G and 3G bioplastics: an overview. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 5, n. 1, p. e2021004, 2021.

VANDI, L. J.; CHAN, C. M.; WERKER, A.; et al. Wood-PHA composites: Mapping opportunities. **Polymers**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2018.

VELJKOVIĆ, V. B.; BIBERDŽIĆ, M. O.; BANKOVIĆ-ILIĆ, I. B.; et al. Biodiesel production from corn oil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 531–548, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136403211830234X>>.

VELP SCIENTIFICA. **N/Protein Determination in Soybean according to the Kjeldahl method**. 2015.

VENTURA, M.; PUYOL, D.; MELERO, J. A. The synergy of catalysis and biotechnology as a tool to modulate the composition of biopolymers (polyhydroxyalkanoates) with lignocellulosic wastes. **Catalysis Today**, v. 397–399, n. September 2021, p. 220–231, 2022. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2021.09.032>>.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 59–65, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001>>.

WEI, Y. H.; CHEN, W. C.; HUANG, C. K.; et al. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 252–265, 2011.

WINNACKER, M. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 11, p. 1–9, 2019.

WIPO. WIPO IP Statistics Data Center. Applications by regions. Disponível em: <<https://www3.wipo.int/ipstats/keysearch.htm?keyId=203>>. Acesso em: 7/9/2022.

WOICIECHOWSKI, A. L.; NITSCHKE, S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: An economic study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 393–400, 2002.

YAFUSO, J. T.; NEGI, V. S.; BINGHAM, J. P.; BORTHAKUR, D. An O-acetylserine (thiol) lyase from *Leucaena Leucocephala* is a cysteine synthase but not a mimosine synthase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1157–1168, 2014.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Yang et al. 2012 value added use crude glycerol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2012.

YANG, X.; XU, M.; ZOU, R.; ANGELIDAKI, I.; ZHANG, Y. Microbial protein production from CO₂, H₂, and recycled nitrogen: Focusing on ammonia toxicity and nitrogen sources. **Journal of Cleaner Production**, v. 291, p. 125921, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125921>>.

YIN, H.; SHEN, H.; LYU, J.; et al. Method for increasing proportion of 4-hydroxybutyric acid monomer in polyhydroxyalkanoate. **China Patent Office**, 2022. China.

ZAINAB, A.; MODU, S.; FALMATA, A. S. Laboratory scale production of glucose syrup by the enzymatic hydrolysis of starch made from maize, millet and sorghum. **Biokemistri**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2011

ZAINAB-L, I.; UYAMA, H.; LI, C.; SHEN, Y.; SUDESH, K. Production of Polyhydroxyalkanoates From Underutilized Plant Oils by *Cupriavidus necator*. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 46, n. 11, 2018

ZHANG, R.; MA, S.; LI, L.; et al. Comprehensive utilization of corn starch processing by-products: A review. **Grain and Oil Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 89–107, 2021

ZHANG, Y.; XIN, J.; CHEN, L.; SONG, H.; XIA, C. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. **Journal of Natural Gas Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 103–109, 2008

ZHOU, K.; YU, J.; MA, Y.; et al. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 7, p. 3280–3295, 2022. Springer US. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-022-03904-w>>.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1 - DESENVOLVIMENTO DE FÓRMULA DO VOLUME DE ALIMENTAÇÃO PARA O MODO DE OPERAÇÃO DE BATELADA ALIMENTADA

Partindo da relação de proporcionalidade

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Estabelecendo as variáveis

- V_{al} : volume de alimentação;
- C_{al} : concentração do composto na solução de alimentação;
- V_0 : volume inicial;
- C_0 : concentração inicial do composto;
- C : concentração do composto no meio em um tempo t determinado.

E estabelecendo que

- C_1 : concentração necessária para retornar à inicial ($C-C_0$)
- V_1 : volume final do meio ($V_0 + V_{al}$)
- C_2 : concentração da alimentação (C_{al})
- V_2 : volume da alimentação (V_{al})

Temos que

$$(C-C_0)(V_0+V_{al}) = C_{al}V_{al}$$

$$(C-C_0)V_0+(C-C_0)V_{al} = C_{al}V_{al}$$

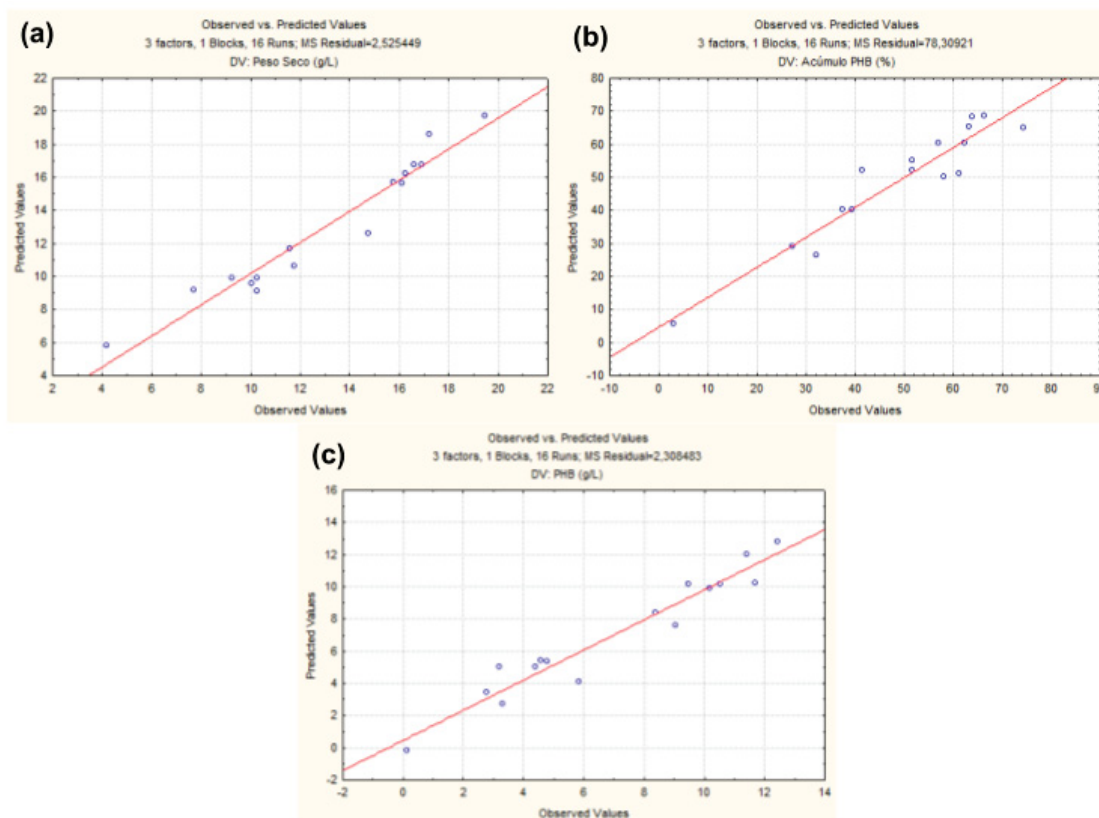
$$(C-C_0)V_0 = C_{al}V_{al}-CV_{al}+C_0V_{al}$$

$$V_{al}(C_{al}-C+C_0) = (C-C_0)V_0$$

$$V_{al} = \frac{(C-C_0)V_0}{C_{al}-C+C_0} \quad \bullet \bullet \quad C_{al} = \frac{(C-C_0)V_0}{V_{al}} + (C-C_0)$$

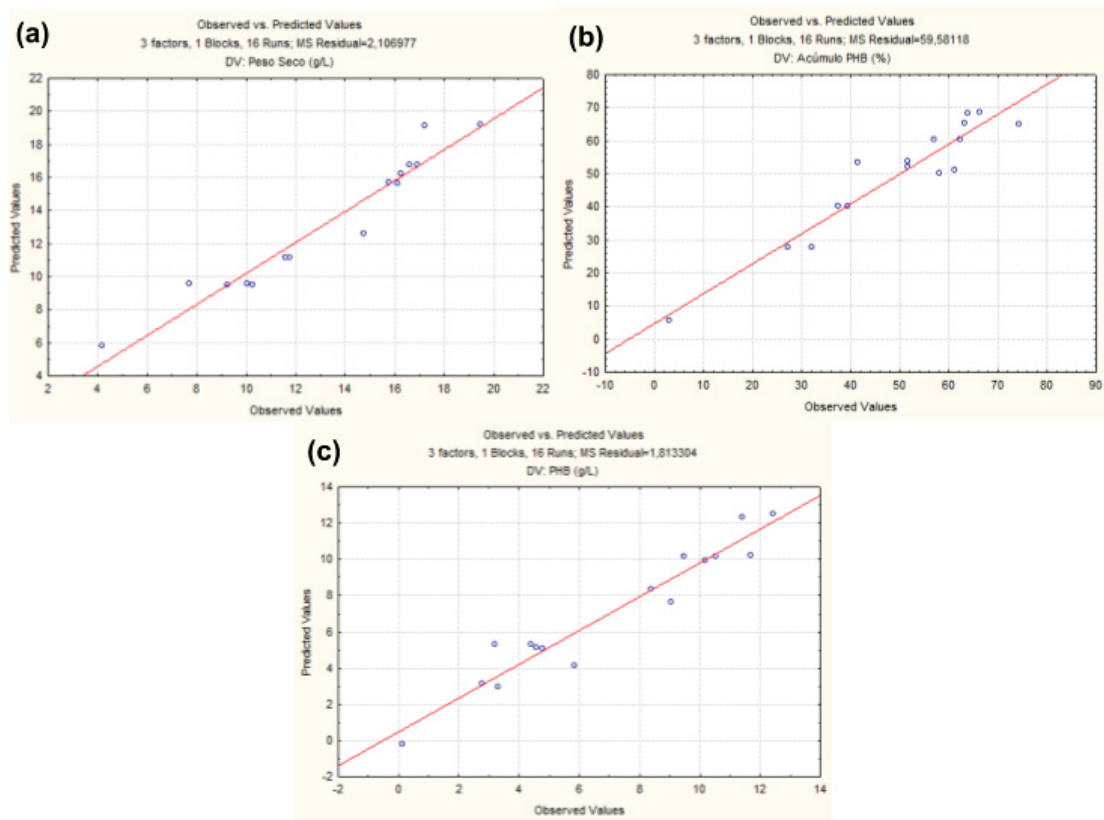
**APÊNDICE 2 - GRÁFICOS DE VALORES PREDITOS E OBSERVADOS DE
MODELOS AJUSTADOS E NÃO AJUSTADOS, DE PARETO DOS MODELOS
NÃO AJUSTADOS E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA CARBONO VS.
NITROGÊNIO E DE NITROGÊNIO VS. KH_2PO_4 DOS MODELOS AJUSTADOS**

GRÁFICOS DE VALORES PREVISTOS E OBSERVADOS DOS MODELOS NÃO AJUSTADOS (A)
MODELO PESO SECO (B) MODELO ACÚMULO DE PHB (C) MODELO CONCENTRAÇÃO DE PHB



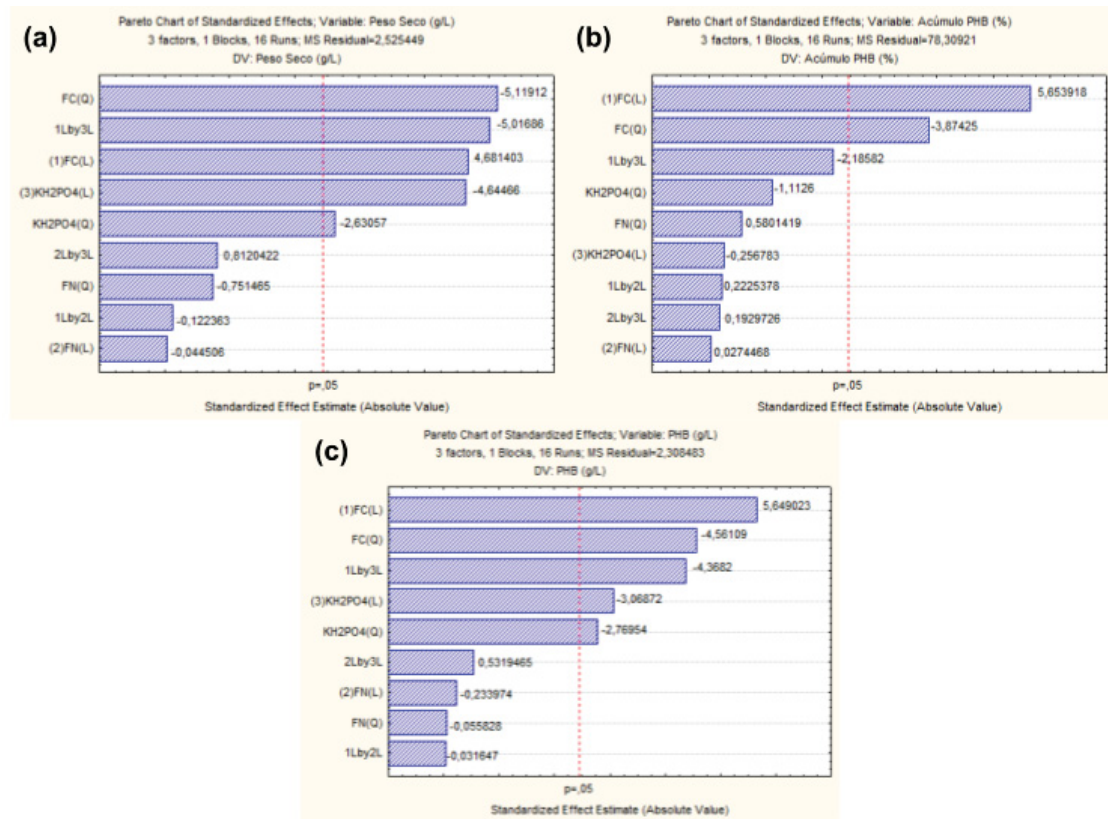
Fonte: A autora (2022)

GRÁFICOS DE VALORES PREVISTOS E OBSERVADOS DOS MODELOS AJUSTADOS (A) MODELO PESO SECO (B) MODELO ACÚMULO DE PHB (C) MODELO CONCENTRAÇÃO DE PHB



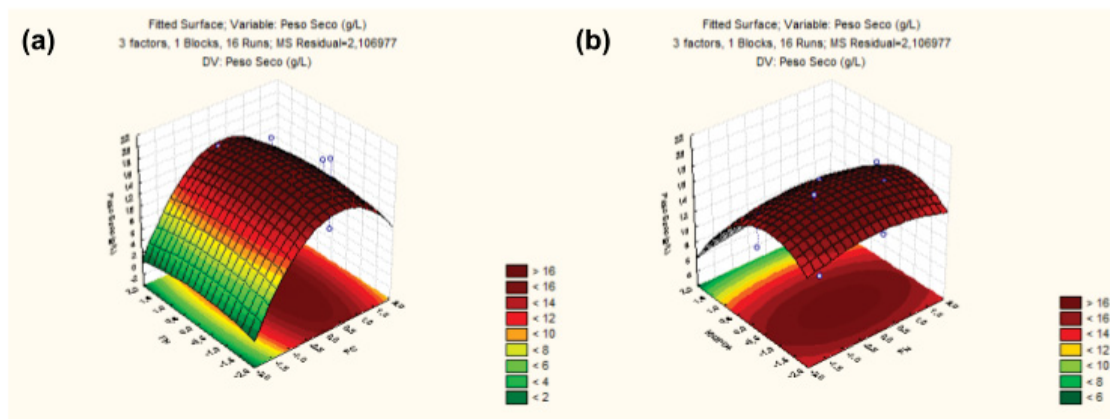
Fonte: A autora (2022)

GRÁFICOS DE PARETO DOS MODELOS NÃO AJUSTADOS (A) MODELO PESO SECO (B) MODELO ACÚMULO DE PHB (C) MODELO CONCENTRAÇÃO DE PHB



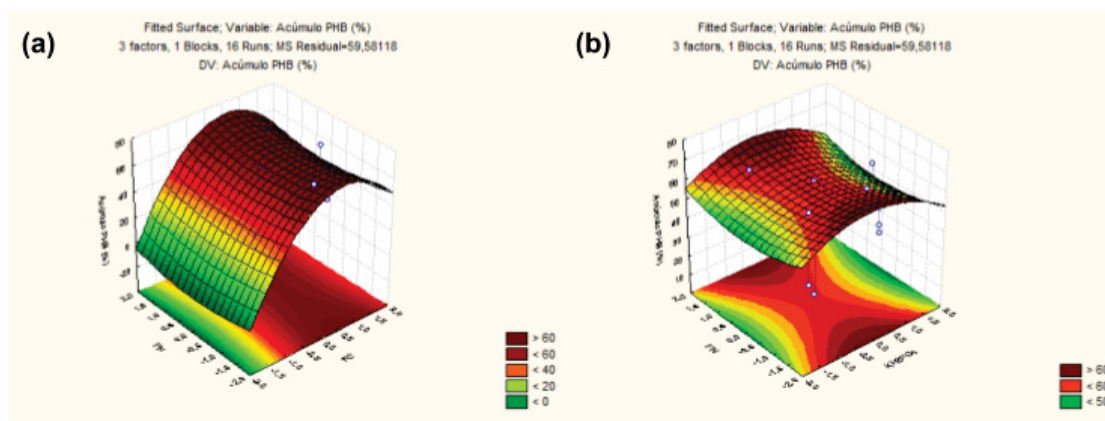
Fonte: A autora (2022)

SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DO MODELO DE PESO SECO (A) FONTE DE CARBONO VS. NITROGÊNIO (B) FONTE DE NITROGÊNIO VS. KH₂PO₄



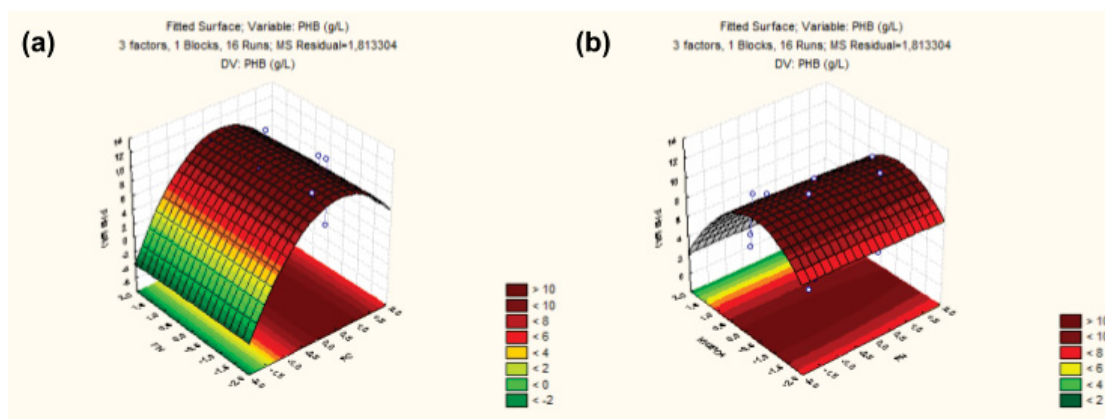
Fonte: A autora (2022)

SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DO MODELO DE ACÚMULO DE PHB (A) FONTE DE CARBONO VS. NITROGÊNIO (B) FONTE DE NITROGÊNIO VS. KH_2PO_4



Fonte: A autora (2022)

SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DO MODELO DE CONCENTRAÇÃO DE PHB (A) FONTE DE CARBONO VS. NITROGÊNIO (B) FONTE DE NITROGÊNIO VS. KH_2PO_4



Fonte: A autora (2022)

APÊNDICE 3 - PUBLICAÇÕES GERADAS DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO, COMO CO-AUTORA DE ARTIGOS E CAPÍTULOS DE LIVRO

Trabalhos publicados

1. Citric acid bioproduction and downstream processing: Status, opportunities, and challenges
 - a. Revista: Bioresource technology (IF 11,889)
 - b. Autores: Sabrina Mores. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Antonio Irineudo Magalhães Júnior, Júlio César de Carvalho, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.1016/j.biortech.2020.124426

2. Xylan
 - a. Livro Biomass, Biofuels, Biochemicals
 - b. Autores: Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Kim Kley Valladares-Diestra, Gustavo Amaro Bittencourt, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.1016/B978-0-12-821888-4.00008-3

3. The 2G and 3G bioplastics: an overview
 - a. Revista: Biotechnology Research and Innovation
 - b. Autores: Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira, Gustavo Amaro Bittencourt, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Zulma Sarmiento Vásquez, Susan Grace Karp, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.4322/biori.202104

4. Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: A review
 - a. Revista: Bioresource technology (IF 11,889)
 - b. Autores: Gustavo Amaro Bittencourt, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Kim Kley Valladares-Diestra, Leonardo Wedderhoff

Herrmann, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Zulma Sarmiento-Vásquez, Susan Grace Karp, Carlos Ricardo Soccol

c. doi 10.1016/j.biortech.2021.125594

5. Bioconversion of potato-processing wastes into an industrially-important chemical lactic acid

a. Revista: Bioresource Technology Reports

b. Autores: Juliana De Oliveira, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Cristine Rodrigues, Poonam Singh Nigam, Vincenza Faraco, Carlos Ricardo Soccol

c. doi 10.1016/j.biteb.2021.100698

6. Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review

a. Revista: Bioresource technology (IF 11,889)

b. Autores: Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Kim Kley Valladares-Diestra, Gustavo Amaro Bittencourt, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Zulma Sarmiento-Vásquez, Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira, Gilberto Vinícius de Melo Pereira, Carlos Ricardo Soccol

c. doi 10.1016/j.biortech.2021.126252

7. Nonwaste technology in the bioethanol and biodiesel industries

a. Livro Biofuels and Bioenergy - Opportunities and Challenges

b. Autores: Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Nelson Libardi Junior, Kim Kley Valladares-Diestra, Gustavo Amaro Bittencourt, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Susan Grace Karp, Luiz Alberto Junior Letti, Carlos Ricardo Soccol

c. doi 10.1016/B978-0-323-85269-2.00019-8

8. Application of enzymes in microbial fermentation of biomass wastes for biofuels and biochemicals production

a. Livro Biomass, Biofuels, Biochemicals

- b. Autores: Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Gustavo Amaro Bittencourt, Kim Kley Valladares-Diestra, Nelson Libardi Junior, Luiz Alberto Junior Letti, Zulma Sarmiento-Vásquez, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Susan Grace Karp, Maria Giovana Binder Pagnoncelli, Cristine Rodrigues, Adenise Lorenci Woiciechowski. Júlio César de Carvalho, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.1016/B978-0-323-90633-3.00012-2
9. Engineering aspects for scale-up of bioreactors
- a. Livro Current Developments in Biotechnology and Bioengineering
 - b. Autores: Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Leonardo Wedderhoff Herrmann, Rafaela de Oliveira Penha, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Walter José Martínez-Burgos, Antonio Irineudo Magalhães Junior, Paulo Cesar de Souza Kirnev, Júlio César de Carvalho, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.1016/B978-0-323-91167-2.00002-2
10. Sugarcane Biorefineries: Status and Perspectives in Bioeconomy
- a. Revista: Bioenergy research (IF 2.814)
 - b. Autores: Susan Grace Karp, Caroline Carriel Schmitt, Renata Moreira, Rafaela de Oliveira Penha, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Leonardo Wedderhoff Herrmann, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.1007/s12155-022-10406-4
11. A concise update on major poly-lactic acid bioprocessing barriers
- a. Revista: Biotechnology Resource Reports
 - b. Autores: Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Carlos Ricardo Soccol
 - c. doi 10.1016/j.biteb.2022.101094

Trabalhos a serem publicados

1. Enzymes for lactose hydrolysis and transformation

- a. Livro Microbial Enzymes in Production of Functional Foods And Nutraceuticals (ISBN 9781032317564)
 - b. Autores: **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Clara Matte Borges Machado, Agnes de Paula Scheer, Aline B. Argenta, Gilberto Vinicius de Melo Pereira, Alexander da Silva Vale, Carlos Ricardo Soccol
 - c. Processo de publicação
 - d. Previsão de publicação: Fevereiro 2023
2. Enzymes from Bacillus spp for nutraceutical production
- a. Livro Microbial Enzymes in Production of Functional Foods And Nutraceuticals (ISBN 9781032317564)
 - b. Autores: Luiz Alberto Junior Letti; Leonardo Wedderhoff Herrmann; Rafaela de Oliveira Penha; **Ariane Fátima Murawski de Mello**; Susan Grace Karp; Carlos Ricardo Soccol
 - c. Processo de publicação
 - d. Previsão de publicação: Fevereiro 2023
3. The corn 1 G bioethanol unities with energy and dried grains with solubles (DDGS) production
- a. Livro Liquid Biofuels: Bioethanol (ISBN 978-3-031-01240-2)
 - b. Autores: **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Kim Kley Valladares-Diestra, Gustavo Amaro Bittencourt, Walter José Martinez Burgos, Carlos Ricardo Soccol
 - c. Processo de publicação
 - d. Previsão de publicação: 2022 - 2023
4. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoates coupled production
- a. Livro: Biohydrogen – Advances and Processes
 - b. Autores: **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Zulma Sarmiento-Vásquez, Clara Matte Borges Machado, Natália Rodrigues Nitsch, Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, Walter José Martinez Burgos, Carlos Ricardo Soccol
 - c. Processo de revisão

- d. Previsão de publicação: 2023
5. Emerging technologies, recent developed processes, patents and innovation about second and third generation bioplastics
- a. Livro: Second and Third Generation Bioplastics – Production, Application and Innovation
 - b. Autores: **Ariane Fátima Murawski de Mello**, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Clara Matte Borges Machado, Manuela Cardozo, Gustavo Amaro Bittencourt, Leonardo Wedderhoff Herrmann, Priscilla Zwiercheczewski de Oliveira, Carlos Ricardo Soccol
 - c. Processo de revisão
 - d. Previsão de publicação: 2023