



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Fermentação Alcoólica em Batelada
Alimentada Empregando *Saccharomyces
cerevisiae* de Características Floculantes**

Carla Zanella Guidini

UBERLÂNDIA – MG

ABRIL DE 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Fermentação Alcoólica em Batelada **Alimentada Empregando *Saccharomyces*** ***cerevisiae* de Características Floculantes**

Carla Zanella Guidini

Orientador: Dr. Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Co-orientadora: Dra. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA – MG

ABRIL DE 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

G947f Guidini, Carla Zanella, 1983-
2013 Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes / Carla Zanella Guidini. -
2013.
 127 f. : il.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.

Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia Química - Teses. 2. Álcool - Teses. 3. Fermentação - Teses.
4. Levedos - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 16 DE ABRIL DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro
Orientador (PPGEQ/UFU)



Profª. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
Co-Orientadora (PPGEQ/UFU)



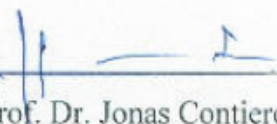
Profª. Dra. Miriam Maria de Resende
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
(PPGEQ /UFSCAR)



Prof. Dr. Jonas Contiero
(IB/UNESP – Rio Claro)

Dedico em especial a Deus que é a maior razão de meu viver, pois sem Ele, nada seria possível, aos meus pais Selvino e Fiora, pela força, encorajamento e amor, a minha irmã Kelli e ao meu amado esposo Paulo Henrique; pelo apoio e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Muito Obrigada

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu mestre maior, por mais uma oportunidade de crescimento e aprendizado confiada a mim, pelo seu amparo, auxílio e amor incondicional.

Aos meus amados pais, Selvino e Fiora, pela formação do meu caráter, pelos ensinamentos e exemplos preciosos, principalmente sobre o que é gentileza, respeito e educação para com os outros. Agradeço também as orações que minha mãe, incansavelmente, fez nos momentos mais difíceis da minha vida. À minha querida irmã, Kelli, pelo amor e apoio demonstrado.

Ao Paulo Henrique, meu amado esposo e eterno companheiro. Minha eterna gratidão e todo meu amor.

Ao meu querido orientador, mestre e amigo, Professor Eloízio Júlio Ribeiro, os maiores e mais sinceros agradecimentos, com quem aprendi muito nesses mais de cinco anos de convivência.

À professora Vicelma Luiz Cardoso, pela paciência, amizade, disponibilidade e solicitude constante. A sua dedicação foi de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos professores da FEQUI, em especial à professora Miriam Maria de Resende, pela ajuda prestada e pelo carinho pelo qual sempre me tratou.

À banca examinadora por terem aceitado o convite e contribuírem com o enriquecimento do trabalho.

Aos funcionários da FEQUI: Cecília, Silvino, Tiago, Gabriel, Édio, Paulo, Roberta e Cleuzilene pela disposição e prontidão em ajudar-me sempre que precisei. Aos alunos de iniciação científica Arthur e Larissa pela ajuda prestada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

Aos queridos amigos de laboratório, pela amizade e companheirismo.

A FAPEMIG pela confiança depositada e suporte financeiro.

Ao CPQBA e ao CTC pela doação das leveduras.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta etapa...

*Três verbos existem que, bem conjugado, serão lâmpadas luminosas em nosso caminho –
Aprender, Servir e Cooperar.
Três atitudes exigem muita atenção – Analisar, Reprovar e Reclamar.
Dê três normas de conduta jamais nos arrependermos –
Auxiliar com a intenção do bem, Silenciar e Pronunciar frases de bondade e estímulo.
Três diretrizes manter-nos-ão, invariavelmente, em rumo certo –
Ajudar sem distinção, Esquecer todo mal e Trabalhar sempre.
Três posições devemos evitar em todas as circunstâncias –
Maldizer, Condenar e Destruir.
Possuímos três valores que, depois de perdidos, jamais serão recuperados –
A hora que passa, A oportunidade e A palavra falada.
Três programas sublimes se desdobram à nossa frente, revelando-nos a glória da Vida
Superior –
Amor, Humildade e Bom ânimo.
Que o Senhor nos ajude, pois, em nossas necessidades, a seguir sempre três abençoadas
regras de salvação –
Corrigir em nós o que nos desagrada em outras pessoas.
Amparar-nos mutuamente.
Amar-nos uns aos outros*

Chico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTADE TABELAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Etanol.....	4
2.2 Matérias-prima.....	7
2.2.1 Cana de açúcar como principal matéria-prima para produção de etanol.....	7
2.2.2 Outras matérias-primas para produção de etanol.....	8
2.3 Biorreatores.....	9
2.3.1 Processo batelada.....	10
2.3.2 Processo batelada alimentada.....	11
2.3.4 Processo contínuo.....	12
2.4 Bioquímica da fermentação alcoólica.....	13
2.4.1 Fatores que a afetam a fermentação alcoólica.....	16
2.5 Levedura.....	18
2.5.1 Efeitos dos produtos de fermentação sobre a levedura.....	18
2.6 Levedura floculante.....	19
2.6.1 Fatores que influenciam a floculação.....	23
2.6.1.1 Fatores genéticos.....	23
2.6.1.2 Fatores fisiológicos.....	24
2.6.1.3 Influência da concentração de cálcio e sais do meio.....	24
2.6.1.4 Açúcar.....	25
2.6.1.5 Influência do etanol.....	26
2.6.1.6 Agitação e aeração.....	26
2.6.1.7 Temperatura.....	27
2.6.1.8 pH.....	28
2.7 Floculação por bactérias e contaminação bacteriana.....	28

2.8 Desfloculação de leveduras.....	30
2.9 Aplicações das leveduras floculantes em processos biotecnológicos.....	30
2.10 Produção de bioetanol a partir de levedura floculante.....	31
2.11 Capacidade fermentativa.....	31
2.12 Cinética da fermentação alcoólica.....	33
CAPÍTULO 3– MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Material.....	37
3.1.1 Micro-organismo e meio de cultura.....	37
3.1.2 Procedimento e unidade experimental.....	37
3.2. Métodos.....	39
3.2.1 Métodos analíticos.....	39
3.2.1.1 Determinação da concentração celular.....	39
3.2.1.2 Desfloculação.....	39
3.2.1.3 Contagem do número inicial de células.....	39
3.2.1.4 Contaminação bacteriana.....	40
3.2.1.5 Determinação de açúcar e etanol.....	41
3.2.1.6 Pré-fermentação.....	41
3.2.2 Metodologia experimental.....	41
3.2.2.1 Seleção da levedura.....	41
3.2.2.2 Características fenotípicas.....	43
3.2.2.3 Concentração celular no inóculo.....	44
3.2.2.4 Influência da concentração inicial de substrato, concentração celular e do tempo de enchimento do reator operado em batelada alimentada.....	44
3.2.2.5 Estudo da recirculação de células e concentração inicial de etanol na fermentação alcoólica.....	48
3.2.2.6 Cinética da fermentação alcoólica e modelagem matemática..	52
3.2.2.6.1 Modelo para a fermentação alcoólica em processo batelada.....	52
3.2.2.6.2 Validação do modelo para a fermentação alcoólica em processo batelada alimentada com e sem recirculação.....	54
3.2.2.6.3 Ajustes dos parâmetros cinéticos.....	56
3.2.2.7 Estudo da produção máxima de etanol na fermentação	

alcoólica (P' máx).....	56
3.2.2.8 Concentração máxima de etanol em que cessa o crescimento microbiano (P _{máx}).....	57
3.2.2.9 Estudo da velocidade específica de sedimentação da levedura C2/00.....	57
3.2.2.9.1 Estudo em proveta da sedimentação da levedura em pH 5.....	58
3.3 Fluxograma representativo de todas as etapas realizadas nesse trabalho.....	59
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 Avaliação da capacidade fermentativa.....	60
4.2 Características fenotípicas da levedura C2/00.....	62
4.3 Concentração celular no inóculo.....	63
4.4 Influência da concentração inicial de substrato, concentração celular no inóculo e de tempo de enchimento do reator batelada alimentada.....	64
4.4.1 Análise dos resultados obtidos para a resposta rendimento em etanol das variáveis estudadas.....	65
4.4.2 Análise dos resultados obtidos para a resposta produtividade em etanol das variáveis estudadas.....	71
4.4.3 Análise dos resultados obtidos para a resposta sacarose residual das variáveis estudadas.....	76
4.5 Influência da recirculação de células e concentração de etanol e sacarose no inóculo na fermentação alcoólica.....	84
4.6 Estimativa dos parâmetros do modelo para a fermentação em batelada.....	94
4.6.1 Validação do modelo para a fermentação em batelada alimentada.....	95
4.6.2 Validação do modelo para a fermentação em batelada alimentada com recirculação de meio fermentativo.....	97
4.7 Perfil da produção máxima de etanol (P' máx).....	100
4.8 Estudo da concentração máxima de etanol em que cessa o crescimento microbiano (P _{máx}).....	101
4.9 Velocidade específica de sedimentação da levedura C2/00.....	101
4.9.1 Sedimentação da levedura utilizando uma proveta em pH 5.....	103
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	105
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	107

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
CAPÍTULO 8- ANEXOS.....	124
CAPÍTULO 9- APÊNDICES.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
Figura 2.2 -	Mecanismo da teoria da lectina na floculação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (a) íons de cálcio permitem que as lectinas alcancem sua conformação ativa e (b) as lectinas ativam a floculação.....	22
Figura 2.3 -	Representação esquemática da multiplicidade de fatores que afetam a floculação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 3.1 -	Representação esquemática da unidade de trabalho (batelada alimentada).....	38
Figura 3.2 -	Fermentador Bioflo 110 operando em batelada.....	38
Figura 3.3 -	Método de plaqueamento em superfície.....	40
Figura 3.4 -	Fluxograma representativo das etapas realizadas no trabalho.....	43
Figura 4.1 -	Comportamento das leveduras em meio fermentativo, (a) C19, (b) C14, (c) C2/95, (d) CTC, (e) C4/00 e (f) C2/00.....	61
Figura 4.2 -	Morfologia lisa da cepa C2/00.....	63
Figura 4.3 -	Valores preditos em função dos observados em relação ao rendimento.....	68
Figura 4.4 -	Distribuição dos resíduos relativos ao rendimento.....	68
Figura 4.5 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração de sacarose e concentração celular no inóculo.....	69
Figura 4.6 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração de sacarose e tempo de enchimento.....	70
Figura 4.7 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função do tempo de enchimento e da concentração celular de inóculo.....	70
Figura 4.8 -	Valores preditos em função dos observados em relação à	

	produtividade.....	73
Figura 4.9 -	Distribuição dos resíduos relativos à produtividade.....	73
Figura 4.10 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração de sacarose e concentração celular no inóculo.....	74
Figura 4.11 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração de sacarose e tempo de enchimento.....	75
Figura 4.12 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função do tempo de enchimento e da concentração celular de inóculo.....	75
Figura 4.13 -	Valores preditos em função dos observados em relação à sacarose residual.....	78
Figura 4.14 -	Distribuição dos resíduos relativos à sacarose residual.....	78
Figura 4.15 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de sacarose e concentração celular no inóculo.....	79
Figura 4.16 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de sacarose e tempo de enchimento.....	80
Figura 4.17 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função do tempo de enchimento e da concentração celular de inóculo.....	80
Figura 4.18 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o experimento de validação das condições de otimização obtido pela superfície de resposta e curvas de contorno.....	82
Figura 4.19 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento A, realizado nas condições ótimas do PCC e com recirculação do meio fermentativo, após as 6 horas de enchimento do reator.....	85
Figura 4.20 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento	

	B, realizado nas condições ótimas do PCC e com recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica.....	86
Figura 4.21 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento C realizado nas condições ótimas do PCC. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizada a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica.....	87
Figura 4.22 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento D D realizado nas condições ótimas do PCC. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e iniciado o tempo de enchimento apenas com a levedura decantada no fundo do reator e realizada a recirculação do meio fermentativo após o enchimento de 1,5 L do reator.....	88
Figura 4.23 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento E realizado nas condições ótimas do PCC. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com água destilada até completar 1,5 L de inóculo e realizada a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica.....	89
Figura 4.24 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento F F realizado nas condições ótimas do PCC, porém a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v). Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizada a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica.....	90
Figura 4.25 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento G realizado nas condições ótimas do PCC, porém a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v) e o tempo de enchimento de 4 horas. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido	

	com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizada a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica.....	91
Figura 4.26 -	Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento H realizado nas condições ótimas do PCC, porém a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v) e a concentração de sacarose foi de 220 g/L. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizada a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica.....	92
Figura 4.27 -	Perfil da concentração celular (●), sacarose (■) e etanol (Δ) em função do tempo para o experimento com 160 g/L de concentração de sacarose e 4% (v/v) de concentração celular no reator. As linhas (—) representam o modelo aplicado aos dados experimentais. As linhas pontilhadas (---) representam a perturbação de $\pm 5\%$ no perfil simulado.....	95
Figura 4.28 -	Perfil do volume do reator em relação ao tempo.....	96
Figura 4.29 -	Perfil da concentração celular (●), sacarose (■) e etanol (Δ) em função do tempo para o experimento com 170 g/L de concentração de sacarose, 12% (v/v) de concentração celular no reator e 6 horas de enchimento. As linhas (—) representam o modelo aplicado aos dados experimentais. As linhas pontilhadas (---) representam a perturbação de $\pm 5\%$ no perfil simulado.....	97
Figura 4.30 -	Perfil do volume do reator em relação ao tempo para o experimento em batelada alimentada com recirculação.....	98
Figura 4.31 -	Perfil da concentração celular (●), sacarose (■) e etanol (Δ) em função do tempo para o experimento com 170 g/L de concentração de sacarose, 15% (v/v) de concentração celular no reator e 6 horas de enchimento. As linhas (—) representam o modelo aplicado aos dados experimentais. As linhas pontilhadas (---) representam a perturbação de $\pm 5\%$ no perfil simulado.....	99
Figura 4.32 -	Perfis de concentração de sacarose (■) e concentração de etanol (Δ), concentração celular (●) em função do tempo para o P' máx.....	100

- Figura 4.33 - Perfis de sedimentação em pH 3 (▲), pH4 (□), pH5 (○), pH6 (●) e pH 7 (Δ) em função do tempo..... 102
- Figura 4.34 - Perfil do modelo da velocidade de sedimentação para o teste em proveta (—), perfil de posição do micro-organismo (○) e o perfil do modelo proposto (—) em função do tempo..... 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Composição da cana-de-açúcar.....	8
Tabela 3.1 -	Matriz Planejamento Composto Central do efeito da concentração de sacarose, concentração celular no inóculo e tempo de enchimento do reator.....	46
Tabela 3.2 -	Massa de sacarose adicionada ao meio em função do tempo de fermentação.....	57
Tabela 4.1 -	Parâmetros cinéticos, de rendimento e produtividade obtidos para cada cepa.....	62
Tabela 4.2 -	Relação entre concentração celular no inóculo e respectiva massa seca no reator.....	63
Tabela 4.3 -	Variáveis utilizadas no PCC e suas respectivas respostas em 10,5 horas de fermentação.....	65
Tabela 4.4 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta rendimento com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	66
Tabela 4.5 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta rendimento, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	67
Tabela 4.6 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta produtividade com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	71
Tabela 4.7 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta produtividade, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	72
Tabela 4.8 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta sacarose residual com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	76
Tabela 4.9 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta sacarose residual, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	77
Tabela 4.10 -	Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do	

	modelo em batelada.....	94
Tabela 4.11 -	Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo em batelada alimentada.....	96
Tabela 4.12 -	Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo em batelada alimentada com recirculação.....	98
Tabela 4.13 -	Crescimento da levedura em diferentes concentrações de etanol.....	101
Tabela 4.14 -	Velocidade específica de sedimentação em diferentes valores de pH para a levedura C2/00.....	102

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs_0	Absorbância no tempo inicial t_0	
Abs_t	Absorbância medido no tempo t	
E_0	Concentração de etanol no inóculo	g/L
F	Vazão de alimentação do substrato	L/h
K_i	Constante de inibição do crescimento celular pelo substrato	gs/L
K_S	Constante de saturação para o crescimento celular	gs/L
M_S	Constante de manutenção celular	g/L.h
NCO	Nível de Conversão de Substrato	%
P	Concentração de etanol	g/L
$P_{máx}$	Concentração máxima de produto em que cessa o crescimento do micro-organismo	g/L
$P'_{máx}$	Concentração máxima de etanol	g/L
S	Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada	g/L
S_0	Concentração de sacarose no inóculo	g/L
S_F	Concentração de substrato na alimentação	g/L
t	Tempo de fermentação	h
V	Volume de trabalho do fermentador	L
VCS	Velocidade de consumo de sacarose	g/L.h
VES	Velocidade específica de sedimentação	min ⁻¹
X	Concentração de células	g/L
X_0	Concentração celular no inóculo	% (v/v)
Y	Posição da partícula em um tempo t	cm
$Y_{P/S}$	Rendimento em etanol	% (g _p /g _s)
$Y_{X/S}$	Rendimento celular	% (g _c /g _s)
\emptyset	Produtividade	g/L.h
$\mu_{máx}$	Taxa máxima específica de crescimento celular	h ⁻¹
n	Expoente do termo de inibição pelo produto	-
b	Produção de etanol não associado ao crescimento	g/L.h
σ	Contribuição de substrato para o crescimento e manutenção celular	h ⁻¹
π	Termo de formação de produto associado e não-associado ao crescimento	h ⁻¹
v	Velocidade de sedimentação	cm/min

RESUMO

Com o objetivo de melhorar o desempenho na produção de etanol e diminuir os custos de produção, pesquisas são realizadas no intuito de selecionar linhagens de leveduras que vêm sendo diferenciadas no processo de fermentação alcoólica. Neste trabalho estudou-se a aplicação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com características floculantes em reator batelada alimentada. Avaliou-se a capacidade fermentativa de seis cepas de leveduras floculantes. A levedura C2/00 foi a que gerou maiores produtividade e rendimento em etanol em comparação às outras leveduras testadas. Posteriormente, estudou-se a fermentação alcoólica em processo batelada alimentada utilizando a levedura C2/00. As fermentações foram realizadas a 32°C e pH inicial ajustado em 4,5. O processo foi otimizado com concentração de sacarose de 170 g/L, concentração celular no inóculo de 40% (v/v) e tempo de enchimento de 6 horas, obtendo-se um rendimento de 92,20% em relação ao teórico, produtividade de 6,01 g/L.h e sacarose residual de 42,84 g/L em 10,5 horas de processo fermentativo. Com o intuito de melhorar a produtividade e reduzir o açúcar residual foi estudada a influência da recirculação de células durante o processo fermentativo e a influência da concentração inicial de etanol e substrato no inóculo no processo em batelada alimentada. A partir deste estudo obteve-se 92,75% de rendimento, 9,26 g/L.h de produtividade, 2,9 g/L de concentração de sacarose residual e a concentração de etanol produzido foi de 83,37 g/L em 9 horas de processo fermentativo. Foi proposto o modelo de inibição pelo substrato e produto para a cinética da fermentação alcoólica. Os parâmetros do modelo foram calculados por meio de ajuste não linear aos resultados experimentais de crescimento de leveduras, consumo de substrato e formação de produto para o reator batelada. A velocidade específica máxima de crescimento foi de 0,103 h⁻¹ com K_I e K_S iguais a 109,86 e 30,24 g/L, respectivamente. Com os resultados experimentais do reator batelada alimentada e batelada alimentada com reciclo, constatou um bom ajuste do modelo proposto, resultando em uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,080 h⁻¹ para o processo em batelada alimentada sem reciclo e 0,182 h⁻¹ para o processo batelada alimentada com reciclo de meio fermentativo. A concentração máxima de etanol na qual a produção do mesmo foi completamente inibida (P'máx) foi de 110 g_{etanol} /L, aproximadamente 13,92% (v/v). No entanto a concentração máxima de produto que cessa totalmente o crescimento do micro-organismo (Pmáx) foi de 12% (v/v), correspondendo a 94,8 g/L de etanol. A velocidade específica de sedimentação (VES) para a levedura C2/00 em pH 5 foi de 0,240 min⁻¹ e a velocidade de sedimentação pelo teste da proveta foi de 0,444 cm/min. A fermentação alcoólica, utilizando a levedura floculante *Saccharomyces cerevisiae* em reator batelada alimentada com reciclo de meio fermentativo forneceu maior produtividade e rendimentos quando comparados a dados reportados pela literatura, nos quais utilizaram reator batelada ou batelada alimentada sem reciclo de meio fermentativo.

Palavras-chave: etanol, fermentação alcoólica, levedura floculante, reator batelada alimentada.

ABSTRACT

Researches are done with the aim of select yeast strains that plays a differentiated role in the process of alcoholic fermentation, with the purpose of improve the performance in the ethanol production and decrease the productions costs. In this work it was studied the application of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with flocculent features in fed batch reactor. It was evaluated the fermentative capacity of six strains of flocculent yeasts. The yeast C2/00 was involved in higher productivity and yield in ethanol compared to other yeasts tested. After it was studied the alcoholic fermentation in fed batch reactor using the yeast C2/00. The fermentations were performed at 32°C and initial pH adjusted in 4.5. The process was optimized in sucrose concentration of 170 g/L, cell concentration in the inoculum of 40% (v/v) and filling time of 6 hours, it is obtaining a yield of 92.20% in relation to the theoretical one, productivity of 6.01 g/L.h and residual sucrose of 42.84 g/L in 10.5 hours of fermentative process. It was studied the influence of cells recirculation during the fermentative process and the influence of initial concentration of ethanol and substrate in inoculum on the fed batch process with the aim of improve the productivity and reduce the residual sugar. From of this study it was obtained 92.75% of yield, 9.26 g/L.h of productivity, 2.9 g/L of residual sucrose concentration and the ethanol concentration produced was 83.37 g/L in 9 hours of fermentative process. The inhibition by the substrate and product model to the kinetics of alcoholic fermentation was proposed. The parameters of model were calculated by means of nonlinear adjust to the experimental results of growth of yeast, substrate consumption and formation of product to the batch reactor. The maximum specific speed of growth was 0.103 h⁻¹ with K_I and K_S equal to 109.86 and 30.24 g/L, respectively. With the experimental results of fed batch reactor and fed batch with recycle, it can be noted a good fit to the model proposed, resulting in a maximum specific velocity of growth of 0.080 h⁻¹ to the process in fed batch without recycle and 0.182 h⁻¹ to the fed batch process with recycle of fermentative media. The ethanol concentration in which the production of it is completely inhibited (P'max) was 110 g_{ethanol} /L , approximately 13.92% (v/v). For the result of maximum concentration of product that inhibits fully the microorganisms growth (Pmax) was 12% (v/v), corresponding to 94.8 g/L of ethanol. The specific velocity of sedimentation (SVS) to the yeast C2/00 in pH 5 was 0.240 min⁻¹ and the sedimentation rate of the test beaker was 0.444 cm/min. The alcoholic fermentation, using the flocculent yeast *Saccharomyces cerevisiae* in fed batch reactor with recycle of fermentative media provided higher productivity and yields when compared to the reported data by literature, in which used batch reactor or fed batch without recycle of fermentative media.

Keywords: ethanol, alcoholic fermentation, flocculent yeast, fed batch reactor.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Com a aceleração da demanda por combustíveis fósseis, principalmente com relação aos surtos de crescimento da Índia e da China, e fontes relativamente estagnadas, refletindo em altos preços do petróleo, as bases fundamentais de nossos sistemas de energia, transporte e agricultura estão sendo questionados. Embora tenha havido muita discussão sobre a necessidade de desenvolver fontes limpas e renováveis de energia como a eólica, até o momento não há nenhum sinal de que essa tecnologia seja capaz de produzir energia em grande escala e suficiente para o futuro. A produção de biocombustíveis tem crescido de forma constante e há uma projeção de crescimento ainda maior durante as próximas décadas (HIRA e OLIVEIRA, 2009; ROLZ e LEÓN, 2011). O etanol tem um grande potencial para substituir os combustíveis fósseis, principalmente pelo fato de ser um bicomcombustível renovável, podendo melhorar a segurança energética e reduzir os déficits comerciais. Além disso, a degradação ambiental resultante do excesso de consumo de derivados de petróleo, está ameaçando a sustentabilidade da sociedade humana (SMEETS et al., 2008; GOLDEMBERG, COELHO e GUARDABASSI, 2008; BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008; LIU, ZHAO et al., 2012).

O etanol da cana-de-açúcar representa um caso de sucesso tecnológico para o país. A indústria da cana mantém o maior sistema de energia comercial de biomassa no mundo, por meio da produção de etanol e do uso do bagaço e da palha para geração de eletricidade (SCHULZ, 2010; WU et al., 2011). O uso de etanol à base de cana-de-açúcar não resulta em emissões significativas de gases de efeito estufa. A razão disso é que o CO₂ liberado no processo é reabsorvido pela fotossíntese durante o crescimento da cana-de-açúcar. Toda a energia (calor e eletricidade) gasta durante a produção de etanol vem a partir do bagaço que é usado para gerar eletricidade (GOLDEMBERG, COELHO e GUARDABASSI, 2008). Uma série de países em desenvolvimento conseguiram adotar o sistema brasileiro, reduzindo assim a sua dependência pelo petróleo. A evolução do sistema brasileiro de etanol e seus parâmetros são de interesse primordial para países interessados em produzir bioetanol (HIRA e OLIVEIRA, 2009).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, sigla em inglês) divulgou no dia 11 de fevereiro de 2013 o relatório "USDA's Agricultural Projections to 2022", que traz projeções para a agricultura para o ano de 2022. Dedicado, em parte, ao

mercado dos biocombustíveis, o relatório apresenta também o possível cenário para o mercado de etanol para daqui dez anos, levando em conta suposições específicas relacionadas a condições climáticas, condições macroeconômicas e políticas nacionais e internacionais de biocombustíveis (NOVACANA, 2013).

Entre 2013 e 2022, a oferta dos principais produtores globais (EUA, Brasil, União Européia, Argentina, Canadá, China e Indonésia) deverá subir em cerca de 30% no caso do biodiesel e em 40% para o etanol. Argentina e Brasil devem seguir na liderança das exportações mundiais de biocombustíveis. Os argentinos seguirão especializados em biodiesel de soja, e o Brasil, em etanol de cana. No Brasil, a projeção é de que a produção de etanol cresça 90%, especialmente para suprir à crescente demanda interna por combustíveis com maior mistura de etanol (BRASILAGRO, 2013). Enquanto isso, a União Européia continuará como a maior consumidora e importadora de biocombustíveis. O ritmo das exportações do país para os EUA e União Européia continuará crescendo de maneira estável, o que mantém o Brasil no domínio das exportações mundiais, ao lado da Argentina. A Agência de Proteção Ambiental (EPA) espera que em 2013 os EUA importem 2,5 bilhões de litros de etanol do Brasil. Acredita-se que será preciso ter pelo menos 120 novas usinas no país até 2020, para aumentar a oferta de etanol (UDOP, 2013; NOVACANA, 2013).

A possibilidade de obter um combustível renovável, acessível, disponível, seguro e eficaz é um dos desafios que a humanidade deve enfrentar. No entanto, em alguns casos os custos de produção de etanol combustível são maiores do que os custos de produção de gasolina, embora haja uma forte influência de fatores como os preços do petróleo e matérias-primas para a produção de etanol. No entanto, muitos grupos e centros de pesquisa de diferentes países estão continuamente realizando estudos que visam reduzir os custos de produção do etanol para que este processo seja rentável para a indústria e viável para o consumidor. Tendências de pesquisa e diversas melhorias de processo estão sendo realizadas para reduzir os custos do etanol. Estas tendências de pesquisa estão relacionadas com as diferentes etapas no processamento, como na natureza da matéria-prima, equipamentos, síntese de processos, integração e otimização (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007; GOMES et al., 2012).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem dominado há anos a fermentação alcoólica. A levedura floculante tem uma característica importante, o qual permite que as células de levedura formem flocos e decantem facilmente no caldo fermentado. Quando a separação celular é realizada pela decantação, uma economia significativa é notada no processo, pois não se utiliza centrifugas, o que acarreta em um gasto energético para o

processo (LI et al., 2009; ZHAO et al., 2012; GOMES et al., 2012). Na China, está se utilizando essa tecnologia de levedura floculante e tem sido comercializada com sucesso e sendo economicamente competitiva (ZHAO et al., 2012). Os reatores que utilizam levedura floculante são operados com alta concentração celular, resultando em alta produtividade (CHOI et al., 2010; TANG et al., 2010). Durante a produção de etanol por fermentação em batelada ou batelada alimentada, o uso de levedura floculante é muito promissor, pelo fato de reduzir os custos do processo pela utilização de decantação ao final do processo (CHOI et al., 2010; GOMES et al., 2012).

Baseado no exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar o processo de fermentação alcoólica para a produção de etanol, utilizando uma cepa da levedura floculante da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em reator operando em batelada alimentada. Como objetivos específicos têm-se:

- Avaliar a capacidade fermentativa de seis cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com características floculantes;
- Estudar o efeito da concentração celular, da concentração do substrato e do tempo de enchimento do reator operando em batelada alimentada na fermentação alcoólica, utilizando a metodologia de superfícies de resposta;
- Avaliar a influência do reciclo de meio fermentativo e da concentração de etanol e de sacarose no inóculo na fermentação alcoólica;
- Realizar estudo cinético do processo de fermentação alcoólica na condição otimizada;
- Avaliar a velocidade de sedimentação da levedura C2/00, em diferentes valores de pH, ao final da fermentação.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho. Foi realizada uma revisão atualizada em artigos científicos, dissertações e teses a respeito do processo de fermentação alcoólica. A ênfase principal dessa revisão foi pela produção de etanol, utilizando cana-de-açúcar como matéria prima e a tecnologia de leveduras floculantes no processo em reator batelada alimentada.

2.1 Etanol

Em meados do século XIX, Louis Pasteur estudou o papel dos micro-organismos em fermentações como queijo, leite, iogurte e outros produtos lácteos, algumas bebidas como vinho, combustíveis e a indústria química. A partir desse estudo identificou muitos processos microbianos e descobriu o papel principal da fermentação, qual substrato era necessário para o metabolismo e seus respectivos produtos finais. No novo milênio, a aplicação extensiva de bioprocessos criou um ambiente para muitos engenheiros expandirem o campo da biotecnologia. Uma das aplicações úteis da biotecnologia é a utilização de micro-organismos para a produção de alcoóis e acetona, que são utilizados nos processos industriais (AIBA, HUMPHREY e MILLIS, 1973; BAILEY e OLLIS, 1986).

Em 1929, a grande crise internacional colocou em risco as economias de todos os países, e no Brasil nem a indústria açucareira ficou a salvo, sobrava açúcar e faltava combustível. Em 1931, a primeira destilaria de álcool anidro foi instalada no Brasil e o Governo Federal estabeleceu a obrigatoriedade da mistura de 5% de etanol à gasolina (Decreto 19.717 – como medida de economia na importação de combustível e para amparar a lavoura canavieira). Por muitos anos não houve produção de álcool suficiente para misturar com todo o combustível consumido (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). A fim de enfrentar esta situação, foi criado o Instituto de Açúcar e Álcool (IAA) em 1933, fazendo com que a produção brasileira fosse crescente desde então (PORTO, 2005).

Em 1975, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que diversificou a atuação da indústria açucareira com grandes investimentos apoiados pelo Banco Mundial, possibilitando a ampliação da área plantada com cana-de-açúcar e a implantação de destilarias de etanol. Neste mesmo ano estimulou-se a substituição da gasolina pelo etanol para uso em automóveis e intensificou o uso da mistura de etanol e gasolina como combustível (SIQUEIRA et al., 2008). A experiência serviu como alternativa para diminuir a vulnerabilidade energética do país, devido à crise mundial do petróleo. O desenvolvimento da engenharia nacional, após o segundo choque do petróleo, em 1979, permitiu o surgimento de motores especialmente desenvolvidos para funcionar com etanol hidratado. Em 1984, os carros a etanol passaram a responder por 94,4% da produção das montadoras instaladas no Brasil. Desde 1986, a redução do impacto da crise do petróleo e os planos econômicos internos para combater a inflação estimularam uma curva descendente na produção de carros a etanol, que culminou com a crise de abastecimento de 1989. Com isso, a participação anual dos veículos a etanol caiu para 1,02% na frota nacional, em 2001 (UNICA, 2012).

O Brasil, desde o início de 1970, tem sido o principal produtor de etanol no mundo, utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima. Etanol a partir da cana-de-açúcar com a sua natureza biorrenovável já é um recurso que o Brasil pode utilizar como um dos substitutos para os combustíveis fósseis (LUO, VOET e HUPPES, 2009). A cana-de-açúcar utilizada como matéria-prima é mais eficiente quando comparada a outras matérias-primas como milho e trigo, usados em outros países. Na verdade, a eficiência melhorou com relação ao desperdício. Já que o bagaço da cana é utilizado para produzir eletricidade, tanto para suprir as necessidades da usina como para venda do excesso dessa energia produzida, e os resíduos remanescentes são utilizados como fertilizante (HIRA e OLIVEIRA, 2009).

A indústria revitalizou-se apenas com a introdução dos veículos de combustível flex, em Março de 2003. O governo estimulou o emergente mercado do bicomcombustível. Veículos de combustível flex podem utilizar várias misturas de álcool e gasolina, permitindo assim que os consumidores possam abastecer conforme os preços do mercado. No início de 2005, a venda de veículos flex correspondeu por 57% de todas as vendas (HIRA e OLIVEIRA, 2009). Em 2010 a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U. S. Environmental Protection Agency - EPA) classificou o etanol de cana-de-açúcar brasileiro como bicomcombustível avançado, capaz de reduzir 50% as

emissões de gases de efeito estufa quando se comparado à gasolina. Diversos estudos confirmam que a redução proporcionada pelo etanol de cana-de-açúcar supera essa exigência, podendo chegar a 90%. Essa importante classificação posiciona o etanol brasileiro com destaque no programa americano de Padrão de Combustível Renovável, o Renewable Fuel Standart (RFS2), que regula a produção e uso de bicombustíveis no país (UNICA, 2012).

O etanol pode ser produzido por fermentação alcoólica com açúcares fermentescíveis a partir de produtos agrícolas, materiais celulósicos ou resíduos de plantas (BAPTISTA et al., 2006). As matérias-primas como açúcar e amido são atualmente predominantes a nível industrial, e são até agora economicamente mais favoráveis. Algumas das vantagens da utilização de etanol em relação a outros combustíveis podem ser citadas (HIRA e OLIVEIRA, 2009):

- Combustível renovável;
- O álcool pode ser produzido, de forma simples e com baixo custo;
- Várias fontes de substrato para produção do biocombustível.

Em contrapartida, também existem as desvantagens como: custo alto do etanol, por falta de incentivos do governo e rendimento inferior no motor que o da gasolina (PORTO, 2005, LAVADO, 2009). As desvantagens do petróleo em relação ao álcool combustível são:

- Petróleo tem uma maior toxicidade;
- Produção de poluentes mais perigosos e ameaçadores ao meio ambiente;
- Maior facilidade de explosões e queima acidental;
- Produz uma goma de resíduo sobre as superfícies onde é armazenado, e o combustível deixa depósitos de carbono na câmara de combustão;
- Alto custo na exploração e desenvolvimento do produto.

Para uma produção industrial de etanol viável, o processo de fermentação deve ser extremamente robusto e pouco afetado por pequenas alterações da matéria prima, além da minimização dos custos, como (GOLDEMBERG, COELHO e GUARDABASSI, 2008; MISSAWA, 2009):

- Obtenção do máximo rendimento em etanol;
- Minimização na síntese de outros produtos (como glicerol e ácido láctico);
- Minimização do tempo de fermentação;
- Baixa contaminação bacteriana (ações preventivas, como tratamento ácido do fermento);

- Manutenção da alta viabilidade do fermento;
- Minimização de produtos químicos (como ácidos, antibióticos e antiespumante);
- Minimização dos gastos com manutenção (como limpeza e vazamentos);
- Minimização de gastos de energia e água;
- Automatização das operações manuais (como temperatura, brix e pH).

2.2 Matérias-primas

2.2.1 Cana-de-açúcar como principal matéria-prima para produção de etanol

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma das gramíneas mais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre devido à enorme contribuição sócio-econômica que representa a sua exploração, além de sintetizar e armazenar significativa quantidade de sacarose em seus tecidos de reserva. A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil pelos portugueses no início do século XVI, sendo introduzida em duas regiões distintas: no Nordeste, onde no estado de Pernambuco teve melhores resultados no seu cultivo, e no Sudeste brasileiro, na região de São Paulo (MICHEL JUNIOR, 2010). Sua composição é essencialmente formada de duas partes: uma subterrânea, formada pelos rizomas e pelas raízes e outra aérea constituída pelo colmo, folhas e flores. O colmo constitui um sistema de duas fases: sólida e líquida. A fase sólida é um complexo composto de celulose, lignina e pentosanas, conhecida geralmente como fibra. A fase líquida é uma solução aquosa, contendo uma grande variedade de substâncias orgânicas, entre as quais aproximadamente 90% é sacarose. A composição básica da cana-de-açúcar está apresentada na Tabela 2.1 (DIAS, 2008).

O processamento da cana-de-açúcar se dá pelo esmagamento do colmo, liberando assim o caldo, que é transformado nos principais produtos que é o açúcar e o etanol, via processo fermentativo. Praticamente todos os resíduos da agroindústria canavieira são reaproveitados. A torta de filtro, formada pelo lodo da clarificação do caldo e bagacilho, que é muito rica em fósforo, é utilizada como adubo para a lavoura de cana-de-açúcar. A vinhaça, um subproduto da produção de álcool, contém elevados teores de potássio, água e outros nutrientes, sendo utilizada para irrigar e fertilizar o campo.

Tabela 2.1- Composição da cana-de-açúcar

Componentes	Teor (% em massa)
Sólidos Totais	24 a 27
Sólidos Solúveis	10 a 16
Fibras (base seca)	11 a 16
Água	73 a 76

A cana-de-açúcar, tanto na forma de suco como de melaço, é a matéria-prima mais importante e utilizada em países tropicais e subtropicais para a produção de etanol. Nos países europeus, o melaço de beterraba contendo sacarose é o mais utilizado como matéria-prima. Além destas culturas energéticas, o sorgo doce tornou-se uma matéria-prima com grande perspectiva, considerando que a partir dos seus caules pode ser extraído um suco com um elevado teor de sacarose, os seus grãos contêm uma elevada quantidade de amido, e o seu bagaço é uma fonte importante de biomassa lignocelulósica. Quando se compara a conversão da cana-de-açúcar com a conversão de materiais amiláceos ou biomassa lignocelulósica em etanol, percebe-se uma maior conversão da cana-de-açúcar, pois o açúcar contido na cana é diretamente fermentescível. Para materiais amiláceos há necessidade da hidrólise prévia da matéria-prima o qual não é necessário para açúcares diretamente fermentescíveis como a sacarose na cana-de açúcar (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

2.2.2 Outras matérias-primas para produção de etanol

O bioetanol pode ser produzido a partir do amido, sendo encontrado no trigo, milho, mandioca e batata. Neste processo se faz necessário a hidrólise de cadeias de carboidratos para a obtenção de açúcares. Assim estes açúcares são convertidos em etanol. O amido contido nos grãos, como milho e trigo, é o polímero mais utilizado para a produção de etanol, principalmente na América do Norte e Europa. Nos países tropicais, cultivos amiláceos, como tubérculos (exemplo a mandioca), podem ser utilizados para a produção comercial de etanol. Outra forma de se produzir etanol é a partir de biomassa lignocelulósica. Como exemplo pode ser citado bagaço de cana, palha de milho e trigo, variedades de capins e algumas madeiras, que é um complexo composto por vários polissacarídeos. Esta matéria-prima é considerada uma das mais promissora, pois possui grande disponibilidade e baixo custo, mas ainda falta muito

estudo para tornar essa tecnologia viável. Esta tecnologia é utilizada em países em que o cultivo de culturas energéticas que contenham sacarose ou amido se torna difícil, principalmente pelo clima, tornando materiais lignocelulósicos em uma opção atraente para a produção de biocombustíveis. Porém o principal desafio na conversão de biomassa em etanol é a operação do pré-tratamento. Devido à estrutura do complexo lignocelulósico, o pré-tratamento se torna necessário para a sua degradação, a remoção da lignina, a hidrólise parcial ou total da hemicelulose, e a diminuição da fração de celulose cristalina. Consequentemente, as tecnologias envolvidas são mais complexas levando a custos mais elevados de produção de etanol, se comparado com a cana-de-açúcar, beterraba ou de milho (LIU, 2009; CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é referida como biocombustível de segunda geração. A produção do etanol com base nessas fontes é possível, mas exigirá o domínio de processos e tecnologias que ainda não estão completamente dominadas e desenvolvidas no mundo, em nível de comercialização. O maior problema da comercialização do etanol de segunda geração está associado ao valor do produto, por apresentar processos caros e complexos (LIU, WANG e OUYANG, 2009).

2.3 Biorreatores

Denominam-se biorreatores os reatores nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, que podem ser enzimas ou células vivas (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001; PORTO, 2005). Para projetar um biorreator, alguns objetivos devem ser definidos. As decisões tomadas na concepção do biorreator podem ter um impacto significativo no desempenho global do processo. O conhecimento da cinética de reação é essencial para a compreensão de como funciona um reator biológico. Outras áreas de engenharia de bioprocessos, como balanço e transferência de massa e energia também são necessários para se ter um bom desempenho. O biorreator é o coração de qualquer processo bioquímico em que os micro-organismos são utilizados para a fabricação de uma ampla variedade de produtos. Podem ser citadas algumas das condições principais que um biorreator necessita para o seu bom desempenho (BAILEY e OLLIS, 1986; DOMINGUES, 2001):

- Concentração de biomassa;
- Fornecimento de nutrientes;

- Condições estéreis;
- Remoção de produto;
- Agitação;
- Inibição pelo substrato ou produto;
- Controle da temperatura;
- Aeração;
- Ajuste de pH;
- Conhecimento do metabolismo e atividades microbianas.

As fermentações industriais podem ser classificadas de acordo com os tipos de alimentação das dornas, em processos contínuos e descontínuos. Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle-Boinot, o qual consiste na reutilização de fermento de uma batelada para outra e na alimentação do substrato realizada em um determinado tempo. No Brasil esse processo passou a ser chamado de batelada-alimentada (BAILEY e OLLIS, 1986; DOMINGUES, 2001).

2.3.1 Processo batelada

O processo descontínuo simples é efetuado com um inóculo por tanque, que consiste na preparação do substrato adequado ao desenvolvimento do micro-organismo. Na batelada simples, a fermentação só tem início após o preenchimento do fermentador, momento em que se mistura o mosto com o fermento. A fermentação é considerada concluída quando a cuba “morre”, ou seja, quando cessa a atividade biológica por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor, no caso o etanol. A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e produtividades, pois quando o substrato é adicionado de uma só vez no início da fermentação ele exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam. O uso desse tipo de processo fica restrito praticamente para fermentações laboratoriais, farmacêuticas e na produção de cachaça (TOSETTO, 2002; CARVALHO e SATO, 2001; PORTO, 2005).

O processo batelada tem como vantagem as boas condições de assepsia e a possibilidade de realizar a manutenção sempre que for necessário. Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo, assim

como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO e SATO, 2001; SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

2.3.2 Processo batelada alimentada

A utilização do processo batelada alimentada, também conhecido como “Melle-Boinot” no Brasil, se generalizou no final da década de 60 e nos anos 70. Quando houve a criação do programa Nacional do Alcool, em 1976, todas as destilarias foram equipadas com este processo. Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos gerados permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001). Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO e SATO, 2001). O desenvolvimento de uma estratégia de alimentação apropriada é um ponto importante em cultivo de fermentação em batelada alimentada. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para controlar a concentração de nutrientes dentro do intervalo ótimo, e tem sido aplicada para a cultura de células de alta densidade de vários micro-organismos (LEE et al., 1999). O processo “Melle-Boinot” foi introduzido com o intuito de aumentar a produtividade em relação à batelada, que tem baixa produtividade e é lenta. Algumas vantagens podem ser citadas, como:

- Economia de açúcar para a reprodução celular;
- Maior rendimento em etanol;
- Eliminação de contaminantes pela centrifugação ou sedimentação do meio fermentado (separação de células de levedura);
- Fermentação mais pura devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido);
- Eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do “pé de cuba”, prática exigida no processo clássico, diminuindo, portanto, a complexidade das operações na planta;

➤ Grande potencial para a automação de processos e redução de custos operacionais.

Este tipo de processo tem como principal característica o reciclo do fermento. A separação das leveduras do mosto fermentado é feita em centrífugas ou sedimentadores pela diferença de dimensões e densidades. Assim, durante a centrifugação ou decantação, uma boa parte das bactérias presente no mosto é arrastada com o vinho, conferindo, desse modo, uma elevada pureza ao leite de levedura resultante. Após a separação da levedura do vinho, o fermento sofre um tratamento com ácido sulfúrico na cuba de tratamento. As bactérias remanescentes não conseguem sobreviver à alta concentração de íons hidrogênio, ocorrendo o mesmo com as células velhas de leveduras, enquanto que as células jovens resistem muito bem ao baixo pH. Após o tratamento ácido, o fermento retorna ao processo de fermentação na forma de um pé-de-cuba (VIEGAS, 1999; BORGES, 2008).

Choi et al. (2010) citam a redução de custos ao se utilizar levedura floculante em reator batelada alimentada com a recuperação de células sem a utilização de centrífugas, utilizando apenas sedimentadores. Durante a produção de etanol por fermentação em batelada alimentada utilizando leveduras floculantes os custos podem ser reduzidos na recuperação das células, pois as células floculantes são facilmente separadas do meio sem o uso da centrifugação.

2.3.4 Processo contínuo

Em relação aos processos contínuos, os primeiros sistemas foram os de dornas ligadas em série, com quantidade e tamanhos variados, em cascata, em que as primeiras dornas continham cerca de 70% do volume total da fermentação. Com a evolução dos processos da fermentação, ocorreu otimização dos mesmos, diminuindo o tempo de fermentação e aumentando a produtividade. O processo de fermentação alcoólica contínua pode ser dividido em 3 partes: unidade de tratamento ácido, unidade de separação de células de leveduras e fermentadores. As células de leveduras, após terem sido submetidas ao tratamento ácido (fermento tratado), deixam as unidades de tratamento e são misturadas com o meio de alimentação (mosto). Esta mistura é então enviada aos fermentadores. A fração entre a vazão de fermento tratado e a vazão total de alimentação dos fermentadores é chamada de taxa de reciclo. Depois de ocorrida a transformação dos açúcares em álcool, o vinho fermentado contendo células de

leveduras (vinho bruto) é enviado para a unidade de separação (ANDRIETTA, 1994). Algumas vantagens observadas na condução dos processos contínuos podem ser citadas, como (FACCIOTTI, 2001; BORGES, 2008; PACHECO, 2010):

- Maior produtividade;
- Menor volume de equipamentos em geral;
- Amplas possibilidades de total automação;
- Redução do consumo de insumos, de uma maneira geral;
- Trabalham em condições ótimas de operação no estado estacionário.

Porém, também há desvantagens como:

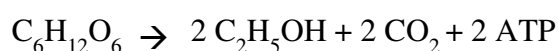
- Possibilidade maior de contaminação;
- Possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas e seleção de mutantes menos produtivos;
- Dificuldades de operação em estado estacionário, como: formação de espuma, crescimento do micro-organismo nas paredes do reator ou nos sistemas de entrada e saída do produto;
- Dificuldade de manutenção de homogeneidade no reator, quando se trabalha com vazões baixas;
- Maior investimento fixo na planta.

A implementação industrial de sistemas de fermentação contínua utilizando células de levedura floculantes requer um conhecimento e compreensão dos mecanismos de floculação de levedura, para poder controlar e desenvolver estirpes de levedura com a capacidade de floculação adequada. Além disso, esta perspectiva deve ser integrada juntamente com o desenvolvimento do desenho do reator e condições de operação. Geralmente utilizam-se fermentadores tubulares para fermentação alcoólica, utilizando levedura floculante em processo contínuo (ZARPELON e ANDRIETTA, 1992; PORTO, 2005). Ghose e Thyagi (1979) citam que sistemas de fermentação alcoólica contendo reatores em série são mais produtivos que os constituídos de um único reator (ANDRIETTA, 1994; ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2008).

2.4 Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é a ação das leveduras sobre açúcares fermentescíveis (LIMA e MARCONDES, 2002). Bioquimicamente, a fermentação é a oxidação

incompleta do açúcar, gerando como subproduto um composto orgânico oxidável. Inicialmente a sacarose, que é o seu açúcar de reserva, sofre hidrólise pela enzima invertase sendo convertida em glicose e frutose. Ambas entram na via glicolítica e, através de uma sequência de reações, são convertidas a piruvato. Este, primeiramente é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído e liberando CO₂. Posteriormente o acetaldeído é reduzido a etanol, sendo essa reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase (*ADH*) (MISSAWA, 2009). Globalmente, a fermentação alcoólica pode ser entendida como a transformação de açúcares em etanol e pode ser traduzida pela seguinte reação:



De acordo com a estequiometria, a conversão de 1 g de glicose deveria produzir 0,51 g de etanol e 0,49 g de dióxido de carbono. No entanto, a síntese celular e de produtos secundários limitam o rendimento estequiométrico a valores inferiores a 100% desta conversão. A fermentação alcoólica resulta de dois processos distintos, glicólise (via de Embden-Meyerhof-Parnas) e o metabolismo anaeróbico do piruvato. Em micro-organismos eucarióticos, a glicólise realiza-se na matriz citoplasmática, e divide-se em duas partes; a fase inicial de seis carbonos e a fase final de três carbonos. O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia Adenosina Trifosfato (ATP) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO₂ resultantes constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (ROMÃO, 2011).

Na fase dos seis carbonos, ocorre a fosforização da glicose, por duas vezes, originando frutose 1,6-bi fosfato, com consumo de duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Na fase dos três carbonos, ocorre a conversão a piruvato, formando-se quatro moléculas de ATP. O processo de redução de piruvato a etanol pode dividir-se também em duas etapas; numa primeira etapa ocorre a descarboxilação do piruvato numa reação irreversível catalisada pelo piruvato descarboxilase, e na segunda etapa o acetaldeído é reduzido a etanol. O etanol e CO₂ resultantes se constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). A transformação da sacarose em etanol e CO₂

indústria, o rendimento de etanol, que é calculado com base na alimentação total de açúcar no sistema chega à faixa de 90 - 93% em relação ao seu valor teórico (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

As leveduras são os micro-organismos mais comumente usados para fermentação alcoólica. Cultivo anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae* gera, além de etanol e dióxido de carbono, glicerol, biomassa celular e outros subprodutos. O dióxido de carbono é um produto de fermentação inevitável, mas este gás pode ser recuperado e comercializado. O glicerol pode ser produzido como um soluto compatível durante o estresse osmótico (SIQUEIRA et al., 2008). Durante o processo fermentativo, as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais que influenciam diretamente na multiplicação, no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento e multiplicação das leveduras, na geração de biomassa e na produção de carboidratos de reserva (SANTOS, 2008). O fósforo integra as moléculas de ácidos nucleicos como na formação de ATP. O enxofre é citado como constituinte de aminoácido (AMORIM, BASSO e ALVES, 1996; SANTOS, 2008). Embora muitos pesquisadores tenham estudado a fermentação alcoólica com *S. cerevisiae*, ainda falta o conhecimento aprofundado da sua via metabólica.

2.4.1 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

- Temperatura: A temperatura é um fator muito importante na fermentação alcoólica. As leveduras atuam melhor nas fermentações em temperaturas de 28 e 35°C. Temperaturas elevadas afetam o comportamento da levedura e diminuem o teor alcoólico do vinho, além de contribuir para a multiplicação bacteriana. Com o aumento da temperatura a toxidez do etanol sobre o fermento é intensificada, causando perda de viabilidade celular e causando baixo rendimento (AMORIM, BASSO e ALVES, 1996; SANTOS, 2008). Em temperaturas baixas a fermentação é lenta e a produtividade é baixa. A temperatura ótima de crescimento das leveduras é, geralmente, inferior à temperatura ótima para a produção de etanol (DIAS, 2008). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem uma boa atuação em temperaturas entre 30 a 33 °C (AMORIM, BASSO e ALVES, 1996; SANTOS, 2008).

- pH: O pH do meio fermentativo influencia muito no rendimento em etanol, pelo fato de restringir o crescimento microbiano. O pH ótimo utilizado nas usinas fica na faixa de 4 a 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5. O caldo de cana se adapta bem a essa faixa de pH, pois seu pH natural fica em torno de 5,2 a 6,8. No processo com reutilização da levedura é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante uma ou duas horas, visando a redução da carga microbiana (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001, ROMÃO, 2011). Embora o tratamento ácido se mostre estressante à levedura, ainda apresenta efeito benéfico de controlar a contaminação bacteriana, pois ocorre a redução significativa no número de bactérias (STECKELBERG, 2001).

- Oxigênio: A fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno este denominado “Efeito Pauster”. Este efeito está associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose (STECKELBERG, 2001).

- Viabilidade celular: A viabilidade é um fator importante para a fermentação alcoólica. Quanto maior for a viabilidade celular melhor será o desempenho do processo. Na literatura foi observado que a viabilidade celular diminui continuamente em anaerobiose, mas permanece acima de 95% em aerobiose num sistema de fermentação à vácuo. O aumento da temperatura de fermentação produz uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol no meio e nas células (STECKELBERG, 2001). A temperatura adequada deve ser mantida na fermentação por meio de dispositivos para o resfriamento de dornas. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol. As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes a alta temperatura, mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA FILHO et al., 2005).

2.5 Levedura

As leveduras são micro-organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As células *Saccharomyces cerevisiae* apresentam-se normalmente na forma unicelular, tipicamente esférica ou oval, não filamentosa, com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas células se reproduzem basicamente por brotamento, onde a célula mãe dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001; MISSAWA, 2009). Estes micro-organismos anaeróbios facultativos adaptam-se em condições tanto de aerobiose como de anaerobiose. Tanto na presença de oxigênio livre como na sua escassez, uma série de reações ordenadas ocorrem no interior das leveduras, reações estas catalisadas por enzimas da própria célula e que têm como meta a obtenção de energia química pela degradação de açúcares. Industrialmente, condições são criadas para que as leveduras possam se desenvolver e, paralelamente, produzir etanol em quantidade economicamente viável (SANTOS, 2008).

Entre muitos micro-organismos que tem sido explorados para produção de etanol, *Saccharomyces cerevisiae* ainda permanece como a melhor espécie em muitos aspectos. *Zymomonas mobilis* também tem sido intensamente estudada nas últimas três décadas (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). O grande sucesso da *S. cerevisiae* na indústria de biotecnologia é devido à alta capacidade de produzir etanol e dióxido de carbono a partir de açúcares. Possui importantes características, como tolerância a baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, propriedades como alta competitividade perante contaminação (bacteriana ou por outras leveduras) na fermentação industrial e alta resistência a inibidores presentes na biomassa hidrolisada, além da capacidade de crescer anaerobicamente (MISSAWA, 2009).

2.5.1 Efeitos dos produtos de fermentação sobre a levedura

- Etanol: O etanol é o produto metabólico principal na fermentação de açúcares por leveduras. O efeito inibitório do etanol é resultado de vários aspectos, como composição do meio, temperatura, natureza das cepas e condições de cultura (batelada ou contínua) (STECKELBERG, 2001). O etanol tem efeito inibitório na taxa de crescimento celular a concentrações acima de 15 g/L. À medida que esse produto se acumula durante a fermentação pode atuar como um potente fator de estresse para as células (FERNANDES, 2008).

- Substrato: A levedura também sofre inibição pelo substrato. As linhagens de leveduras normalmente utilizadas nos processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada. O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva a redução em crescimento e perda da viabilidade celular, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior da célula. Essa inibição pode ocorrer em concentrações maiores que 150 g/L (DIAS, 2008; SOUZA, 2009; SCHULZ, 2010).

- Glicerol, Ácido Succínico e Acetato: são subprodutos do metabolismo fermentativo. O glicerol, juntamente com o ácido succínico, são os principais subprodutos da fermentação alcoólica e são responsáveis pela redução do rendimento em etanol, pois consomem 3-5% dos açúcares fermentáveis (GANCEDO e SERRANO, 1989). A produção de glicerol deriva da necessidade, em limitação de oxigênio, oxidar o excesso de NADH formado na glicólise e que não é utilizado como co-substrato da álcool desidrogenase na redução de acetaldeído a etanol. O ácido succínico é formado, durante o metabolismo aeróbico, na presença de elevadas concentrações de glicose, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Uma pequena porcentagem do acetaldeído produzido a partir do piruvato pode ser desviado para a formação de acetato. Embora seja um produto secundário minoritário da fermentação alcoólica, a produção de acetato resulta num excesso de NADH que é compensado pela formação de glicerol (GANCEDO e SERRANO, 1989; FERNANDES, 2008).

2.6 Levedura floculante

A floculação é uma propriedade importante das estirpes de levedura e é normalmente definida como a capacidade das células de se agregarem espontaneamente e formar flocos que são facilmente sedimentados ao final da fermentação de forma eficaz, em vez de centrifugação. Centrífugas são amplamente utilizadas na recuperação de células de levedura livres, poupando o investimento na aquisição e manutenção das centrífugas, bem como o consumo de energia para a operação das mesmas, sendo assim uma operação no processo considerada ambientalmente correta (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008; ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2008; MA et al., 2009; CHOI et al., 2010). Floculação de levedura apresenta também outras

vantagens, como a utilização de reatores de alta densidade celular, o que conduz à produtividade elevada e tempos mais curtos de fermentação e também o uso de diferentes configurações de reatores (DOMINGUES et al., 2000; SOARES, 2010). Leveduras floculantes têm sido tradicionalmente utilizadas pelas indústrias cervejeiras e de vinho, sendo esse processo bem conhecido e desenvolvido. Porém a sua aplicação em outras indústrias biotecnológicas como em processos de fermentação alcoólica ainda necessita de novos avanços (TEIXEIRA et al., 1995, MA et al., 2009).

A levedura floculante pode ser definida como não sexuada, homotípica (envolvendo apenas um tipo de célula nas interações) e reversível (os flocos podem ser reversíveis, por dispersarem pela ação do EDTA ou açúcares específicos, como a manose e ser recuperada pela presença de íons Ca^{2+}). Miki et al., (1982) apresentaram dados que originariam um novo modelo de floculação. O modelo de Miki considerava que a floculação era mediada por um mecanismo específico de reconhecimento celular, envolvendo a ligação entre proteínas da superfície tipo lectina com polissacarídeos, em células adjacentes. Este modelo colaborava com a estereoespecificidade dos íons Ca^{2+} assim como o envolvimento de açúcares na floculação, não explicada pela teoria de pontes de Ca^{2+} . Os íons Ca^{2+} manteriam as lectinas numa forma conformacional ativa. De acordo com a hipótese da lectina, a floculação seria mediada pela interação de dois componentes distintos da mesma superfície celular. O processo multivalente de agregação de células de levedura em massas multicelulares (composto por milhares ou mesmo milhões de células) é chamado de flocos, com a subsequente sedimentação a partir do meio em que eles estão suspensos (STRATFORD, 1992; MA et al., 2008; STEWART, 2009). As células com a capacidade de formar flocos são chamadas de floculantes, enquanto que as células que não formam flocos estão geralmente na forma livre. A floculação pode ser vista como um processo de baixo custo para a realização da fermentação, o qual não requer gastos de energia com centrífugas. Como um processo de auto-imobilização, leveduras floculantes podem ser utilizados em reatores de alta densidade celular, que aumentam a eficiência do processo (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

Um grande interesse tem atraído pesquisadores no estudo de células imobilizadas e floculantes devido a atraentes vantagens técnicas e econômicas em comparação com o sistema de célula convencional livre (SIPSAS et al., 2009). A tecnologia das leveduras floculantes de auto-imobilização parece ser superior às tecnologias de imobilização de células de levedura utilizando suportes. Os principais

problemas com a imobilização artificial são os requisitos para a operação da unidade, pois necessita da operação de imobilização das partículas com os micro-organismos, com isso acarretando em custos adicionais no processo. Vários suportes tem sido utilizados para imobilização de células na fermentação alcoólica, como o alginato de cálcio, material celulósico, casca de laranja, bagaço de cana e entre outros suportes (LIU, WANG e OU-YANG, 2009). Estas células imobilizadas tem um curto tempo de meia-vida, pois quando as células estão aprisionadas podem perder atividade ou morrer (BAPTISTA et. al., 2006). Outro ponto que se deve levar em consideração é o crescimento do micro-organismo que é afetado por fatores como as restrições físicas, o esgotamento de nutrientes e acumulação de metabólitos tóxicos por causa da limitação da transferência de massa (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). A tecnologia de levedura floculante não utiliza nenhum tipo de suporte, o que torna o processo mais simples e economicamente competitivo em comparação com a imobilização de células de levedura, uma vez que o suporte está associado ao maior custo ao final do processo, como também diminui a possibilidade da contaminação da levedura pelo suporte. O crescimento de células de levedura não é substancialmente afetado, garantindo que a fermentação seja realizada de forma eficaz (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é constituída por uma camada interior, composta principalmente por β -glucano e quitina, e por uma camada fibrilar externa constituída predominantemente de α -manana (altamente glicosilada) associado a proteínas (manoproteínas) (VERSTREPEN e KLIS, 2006). Eddy e Phil (1958) referiram à necessidade de controlar de forma precisa alguns aspectos ambientais que influenciam a floculação, pois de outra forma, podem conduzir a uma falsa impressão de variabilidade, muitas vezes associada à floculação. Estes aspectos ambientais incluem a composição química do meio de cultura, nomeadamente o conteúdo em açúcar e sal, pH, temperatura, aeração e agitação. A floculação é um fenômeno complexo influenciado por uma multiplicidade de fatores.

Outro ponto importante na floculação é o estudo genético das células floculantes. Ao permitir um aumento na concentração de biomassa no biorreator a capacidade de floculação de leveduras pode ser um fator importante para o desempenho global do processo. A concentração de células em suspensão é fundamental em linhagens floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* com uma ótima taxa de agregação em concentrações superiores a 10^8 células/mL (ESSER e KÜES, 1983). Existe a

necessidade de pelo menos 30% de leveduras floculantes no meio para que essas induzam as leveduras não floculantes a flocular.

A levedura floculante está sob controle genético e é descrito como uma interação da parede celular. O modelo proposto por Miki et al. (1982) sobre a teoria da lectina (“lectin-like”) é o modelo geralmente aceito por pesquisadores, como está representado na Figura 2.2.

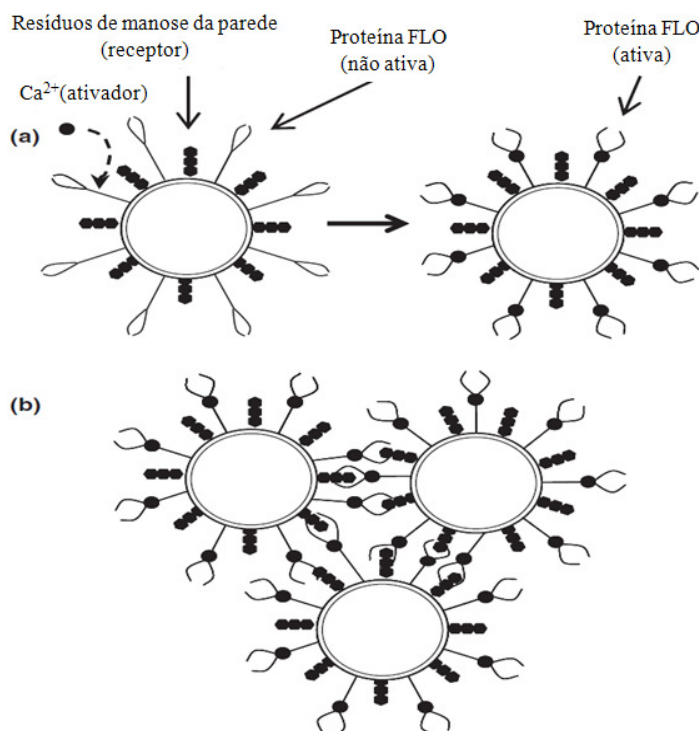


Figura 2.2 - Mecanismo da teoria da lectina na floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: (a) íons de cálcio permitem que as lectinas alcancem sua conformação ativa e (b) as lectinas ativam a floculação (SOARES, 2010)

Neste modelo, um componente específico da parede celular da estirpe floculante, do tipo lectina, irá reconhecer e aderir aos carboidratos das mananas sobre uma célula adjacente, com íons Ca^{2+} que atuam como co-fatores de ativação da capacidade de ligação. As proteínas responsáveis pela adesão de célula-célula ou de células a superfícies abióticas são chamados "adesinas" ou "floculinas", são proteínas da parede celular com diferentes composições de glicoproteínas (ZHAO E BAI, 2009).

Uma das primeiras propostas sugeridas pelos pesquisadores para explicar a floculação foi a teoria coloidal (SPEERS et al., 1992). Segundo esta teoria, a floculação ocorreria devido a uma neutralização da carga da superfície celular não contemplando a

especificidade do íon cálcio. No grupo FLO1 estaria envolvida uma lectina específica para a manose e no grupo NewFlo a lectina envolvida seria específica não só para a manose mas também para a glicose. Teunissen e Steensma (1995) propuseram que as floculinas podem funcionar como lectinas ou pelo menos têm as propriedades de ligação a açúcares associadas às lectinas. Colaborando com este modelo Kobayashi et al. (1998) verificaram que a modificação de duas regiões da proteína FLO1 era suficiente para alterar o padrão de reconhecimento específico da manose (FLO1) para o padrão específico da manose e glicose (NewFlo) (DOMINGUES, 2001).

O fenômeno de co-floculação, entre duas estirpes de *S. cerevisiae* parece resultar da interação entre uma proteína de superfície com um carboidrato presente na superfície celular das células da outra estirpe (NISHIHARA, KIO e IMAMURA, 2000). A co-floculação é definida como sendo o fenômeno de floculação observado quando duas estirpes não floculantes são misturadas.

2.6.1 Fatores que influenciam a floculação

2.6.1.1 Fatores genéticos

Na década de 70 foram identificados alguns genes cromossomais responsáveis pela floculação, o que originou novas pesquisas, mas estudos posteriores revelaram a floculação como um complexo mecanismo molecular (DOMINGUES, 2001). Convém salientar que sendo a hidrofobicidade uma função da composição da parede celular e do seu conteúdo protéico, a influência da hidrofobicidade na floculação não elimina a existência de um mecanismo tipo lectina.

Os fatores genéticos estão associados a diferentes fenótipos. A inibição reversível da floculação pode ser por açúcares, sais, baixo valor de pH e sensibilidade a proteases. Os dois principais fenótipos de floculação são FLO1 e NewFlo, como já citado. O fenótipo FLO1 pode ser inibido por manose e seus derivados, e apresenta uma tolerância ao pH ampliada entre 1,5 e 10. O grupo NewFlo, que é encontrado na maioria das vezes em leveduras de cervejarias, pode ser inibido por açúcares como a manose, maltose, glicose e sacarose, mas não por galactose, e são mais sensíveis à inibição por cátions, valores baixos de pH, e para a digestão por tripsina ou proteinase K. Estes fenótipos também exibem sensibilidade para diferentes condições de cultura, tais como temperatura, além do pH que já foi citado e disponibilidade de nutrientes. O mecanismo

exato de agregação das estirpes pertencentes a estes dois fenótipos está longe de ser compreendido (DOMINGUES, 2001; SOARES, 2010). A floculação em *S. cerevisiae* é controlada geneticamente, e vários genes foram relatados como sendo dominantes e responsáveis por este fenómeno. Entre eles estão: FLO1, FLO5, FLO9 e FLO10 (MISSAWA, 2009). Outros genes FLO foram relatados sendo alelos de FLO1 como FLO2 e FLO4. Produtos de genes FLO5, FLO9 e FLO10 são altamente homólogas de FLO1 (SOARES, 2010). Tornou-se claro, também, que as interações hidrofóbicas desempenham um papel crucial em fenómenos de adesão microbiana. Estudos indicam (utilizando as estirpes de *Saccharomyces*) que um aumento na floculação está fortemente correlacionado com um aumento da hidrofobicidade da superfície celular (TEIXEIRA et al., 1995; STRATFORD, 1989). Alguns pesquisadores descreveram um aumento da hidrofobicidade quando FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 e FLO11 estão presentes na parede celular de levedura (MULDERS et al., 2009; SOARES 2010).

2.6.1.2 Fatores fisiológicos

Foi descoberto em um estudo morfológico que o envelhecimento e a rugosidade da parede celular podem aumentar o potencial da área de superfície de contato em comparação com as células lisas e mais jovens. Também é relatado que as células-filhas novas têm menor capacidade de floculação que células-mãe. No entanto, o aumento de floculação para o final da fermentação dificilmente pode ser explicado somente pelo aumento de células mãe (JIN e SPERRS, 1999).

2.6.1.3 Influência da concentração de cálcio e sais do meio

A floculação é muito influenciada pelo conteúdo salino do meio. É geralmente aceite o efeito positivo dos íons Ca^{2+} na floculação. De forma geral, pode-se afirmar que para baixas concentrações de cátions ocorre um melhoramento da capacidade de floculação, enquanto que, para concentrações elevadas, a inibição da floculação é observada. Outros íons indutores de floculação como Rb^+ , Cs^+ , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} e, principalmente, Mg^{2+} e Mn^{2+} também foram descritos por alguns autores. Já os cátions de Ba^{2+} , Sr^{2+} e Pb^{2+} inibem competitivamente a floculação das leveduras pela semelhança da sua relação iônica com Ca^{2+} (GOUVEIA E SOARES, 2004). Em baixas concentrações, Na^+ e K^+ induzem a floculação, devido à redução das

forças eletrostáticas de repulsão entre as leveduras e/ou estimulam a fuga intracelular de Ca^{2+} (NISHIHARA, TORAYA e FUKUI, 1982; STRATFORD, 1989). Cátions têm um papel importante na floculação da leveduras *S. cerevisiae*. Entre eles, o Ca^{2+} é o mais reconhecido em sua eficácia na promoção da floculação (MIKI et al., 1982).

No entanto, tem sido relatado que o magnésio pode induzir a floculação indiretamente por libertação e estimulação de íons de cálcio intracelulares (STRATFORD, 1989). Há também relatos de floculação causada pela adição de sais de sódio ou de potássio. No entanto, em concentrações altas de sódio ou de potássio, a floculação é inibida competitivamente (JIN e SPERRS, 1999).

2.6.1.4 Açúcar

Os açúcares podem afetar a floculação de levedura agindo em interações célula-célula, ao nível da superfície e sobre a regulação dos genes FLO. Os açúcares fermentáveis induzem a perda de floculação, na fase inicial de crescimento, sendo provável que afete os genes FLO (SOARES e DUARTE 2002; SOARES e VROMAN 2003). Diferentes açúcares afetam a floculação de forma diversa. KIHN, MASY e MESTDAGH (1988) verificaram que enquanto a floculação de uma estirpe de levedura cervejeira mostrava inibição por manose, outras duas eram inibidas por manose, maltose e glicose, não se observando inibição na floculação de uma determinada cepa de *S. cerevisiae* por nenhum destes açúcares (DOMINGUES, 2001). As células sob repressão catabólica, quando transferidas para um meio com uma concentração mais baixa de açúcares têm mostrado um rápido desencadeamento de floculação; este fato sugere uma ligação entre a limitação de açúcar e a indução de floculação (VERSTREPEN e KLIS 2006). A Figura 2.3 representa a multiplicidade dos fatores que afetam a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

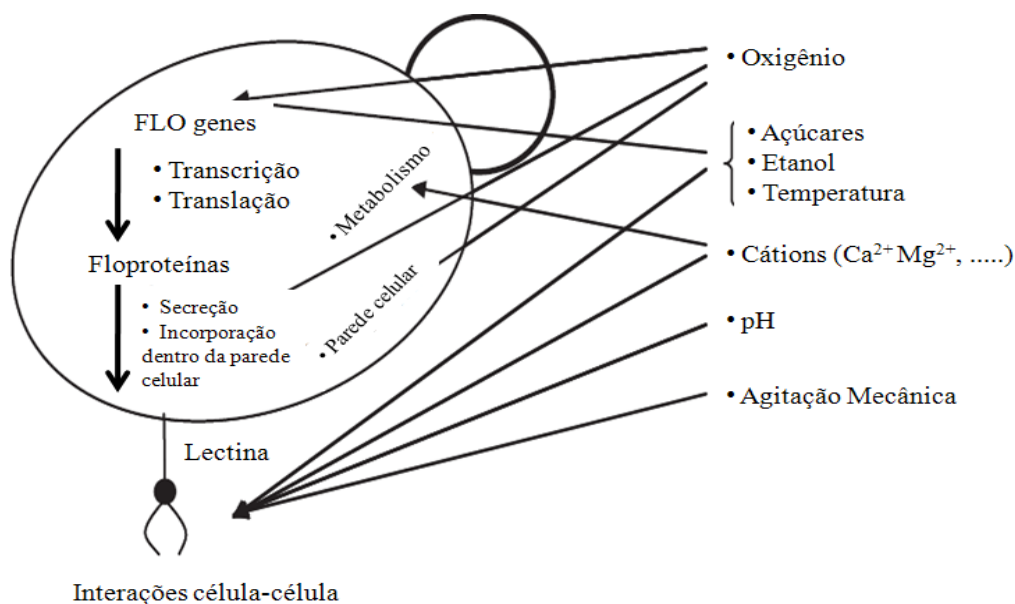


Figura 2.3- Representação esquemática da multiplicidade de fatores que afetam a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SOARES, 2010)

2.6.1.5 Influência do etanol

O etanol parece ter um efeito positivo frente à floculação. Uma das possibilidades que pode ser observada é que a adsorção de etanol à superfície da levedura provoca uma redução local da constante dielétrica e origina uma diminuição da repulsão eletrostática da célula-célula. Segundo SOARES (2010), o etanol e glicerol em concentração de 4% (v/v) não induzem a perda de floculação das células ou crescimento. Estes resultados indicam que a perda de floculação é um processo que exige energia e é influenciado pelo metabolismo da fonte de carbono. A presença de uma quantidade pequena de etanol e em concentrações baixas de fonte de carbono induz uma fase de desenvolvimento da floculação em células que estão crescendo. A escassez de nutrientes combinada com a presença de etanol pode induzir ao aparecimento da floculação (CLARO, RIJSBRACK e SOARES, 2007; SOARES, 2010).

2.6.1.6 Agitação e aeração

A agitação mecânica permite o aumento da energia cinética das células para superar a repulsão mútua entre elas (SOARES, 2010). A agitação produz dois efeitos antagônicos na floculação. Quando a agitação é elevada, a taxa de colisão das partículas

induz a floculação e por outro lado, as maiores tensões de corte provocam a ruptura dos flocos. Um aumento da intensidade de agitação também provoca uma diminuição no tamanho dos flocos (STRATFORD e KENNAN, 1988; DOMINGUES, 2001). Agitação elevada por outro lado pode causar grandes problemas, tais como a formação de espuma. O uso de antiespumante não pode ser sempre adicionado à fermentação, pois o antiespumante pode ter efeitos inibitórios sobre o crescimento dos micro-organismos (BAILEY e OLLIS, 1986).

Os propósitos da aeração e agitação em fermentação são, primeiramente, fornecer oxigênio aos micro-organismos, e agitar o caldo de fermentação de forma que uma suspensão uniforme de micro-organismos esteja dispersa no meio (AIBA, HUMPHREY e MILLIS, 1973; MALTA, 2006). A formação de CO₂ durante a fermentação produz uma agitação natural entre as células em suspensão, que é um fator de floculação. A aeração moderada é benéfica para a floculação da levedura, já uma forte aeração ou em condições anaeróbicas pode provocar a perda da floculação. Estas observações estão em concordância com o fato das manoproteínas da parede celular serem expressas de forma diferente em condições aeróbias ou anaeróbias (MIKI et al., 1982; SOARES, TEIXEIRA e MOTA, 1991; SOARES, 2010).

2.6.1.7 Temperatura

A temperatura pode atuar em níveis diferentes no processo da floculação de leveduras. O abaixamento da temperatura na fermentação leva a uma diminuição no metabolismo da levedura e na produção de CO₂, como consequência, há uma redução da turbulência, o que favorece a sedimentação da levedura. A temperatura também pode afetar a floculação das leveduras, agindo sobre as interações célula-célula. Um aumento na temperatura de 50-60 ° C, durante alguns minutos, promove a dispersão reversível dos flocos, provavelmente devido à desnaturação das lectinas da floculação. A incubação das estirpes de leveduras em temperaturas adequadas para produção de etanol (32-37 ° C) conduz a uma redução ou diminuição da floculação (SOARES, 2010).

Nas usinas de etanol as leveduras desenvolvem-se bem em temperaturas de 30 a 33°C ou até em temperaturas superiores. Porém a elevação da temperatura do meio em fermentação causa queda nos rendimentos e eficiências do processo fermentativo, pois em altas temperaturas, a toxidez do etanol sobre o fermento é intensificada, causando perda de viabilidade celular (AMORIM, BASSO e ALVES, 1996).

2.6.1.8 pH

O pH do meio em processos fermentativos também é muito importante. Valores extremos de faixa de pH promovem a dispersão reversível dos flocos. Provavelmente a alteração de pH altera a ionização dos aminoácidos das lectinas dos flocos e como consequência a alteração da sua conformação (JIN, RITCEY e SPEERS, 2001; SOARES, 2010). A adição de 0,35g de H₂SO₄ por litro de mosto supre as necessidades de enxofre bem como serve para manter o pH na faixa de 3,5 a 4,5, o que inibe o desenvolvimento de diversas bactérias (SANTOS, 2008).

Segundo Jin e Speers (1999) a floculação ocorre mais facilmente ao final da fermentação em que o valor de pH do mosto geralmente cai de 5,2 para 4,5 a 4,0. A concentração de íons de hidrogênio foi considerada como um fator importante para promover a floculação. A baixa carga de superfície causada pelo aumento da concentração de íons de hidrogênio pode ter um papel importante para a teoria coloidal de floculação. É de se esperar que a baixa carga de superfície melhore o contato célula-célula e aumente a taxa de floculação (JIN e SPERRS, 1999). No entanto, o valor de pH é geralmente considerado como um fator secundário, em condições de fermentação e as células de levedura podem flocular entre a faixa de pH 3 - 8, variando de acordo com as estirpes (CALLEJA, 1987; SMIT et al., 1992, JIN e SPEERS, 1999).

2.7 Floculação por bactérias e contaminação bacteriana

A fermentação industrial não é conduzida em condições de completa assepsia, pois é muito difícil de ter uma assepsia total do processo, com isso a contaminação bacteriana, que é causada principalmente por *Lactobacillus* e *Bacillus*, está presente no processo. O mecanismo de floculação por contaminação bacteriana ocorre entre as bactérias presentes na fermentação alcoólica e as leveduras, e está associado ao contato físico entre a parede celular dos dois micro-organismos, existindo uma relação ótima entre a quantidade de células de bactéria e levedura para causar a floculação (YOKOYA e OLIVA-NETO, 1991).

O fenômeno de indução da floculação de leveduras por células de bactéria parece envolver lectinas da paredes celular das bactérias, ou, alternativamente, polissacarídeos de elevada massa molecular que formam pontes entre lectinas de células floculantes (ZARATTINI et al., 1993, DOMINGUES, 2010).

Utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima pode-se observar contaminantes que são habitantes naturais da própria planta, do solo, da matéria orgânica em decomposição e micro-organismos associados às pragas e moléstias da planta. Entre as espécies encontradas destacam-se as bactérias gram-negativas do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*; as bactérias gram-positivas do gênero *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*; bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces* e *Actinomyces* e as leveduras e bolores como *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporiu* (YOKOYA e OLIVA-NETO, 1991; STECKELBERG, 2001). Outros fatores além da matéria-prima levam a ocorrência dos micro-organismos contaminantes no meio fermentativo, como as operações preliminares tanto na limpeza como no armazenamento realizado antes da fermentação alcoólica. Dependendo desses fatores pode-se ter perda de açúcares, formação de compostos tóxicos causadores de redução da viabilidade celular, até mesmo ao comprometimento da qualidade do produto final (STECKELBERG, 2001).

As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana bem como o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A infecção bacteriana na fermentação pode causar outros danos ao processo tais como: consumo de açúcar, formação de goma, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas, ácidos orgânicos excretados no meio e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (LIMA et al., 2001; SCHULZ, 2010).

Quando se trata de contaminação por bactérias, a contaminação pode ser facilmente controlada utilizando-se agentes antibacterianos, como antibióticos (AQUARONE, LIMA e BORZANI, 1983). A ação destes agentes decorre de suas propriedades bacteriostáticas, no qual a penicilina é um bom inibidor de contaminações. A aplicação é econômica, não exigindo modificações no processo, assim as fermentações são mais puras e regulares. Pode-se usar também cloranfenicol, tetraciclina e clorotetraciclina. A escolha do antibiótico depende de seu custo no tratamento (LIMA et al., 2001; CAETANO e MADALENO, 2011).

Os antibióticos Kamoran WP® e Penicilina, o primeiro à base de monensina, são os mais utilizados, sendo que a concentração industrialmente utilizada de Kamoran WP® é de 3 ppm. A monensina é considerada mais eficiente na ação contra bactérias Gram-positivas, maiores produtoras de hidrogênio, precursor de metano, do que contra as Gram-negativas (MORAIS et al., 2006).

2.8 Desfloculação de leveduras

Acredita-se que o complexo exterior de fosfomananas e proteínas seja essencial para a floculação, já que o tratamento com enzimas como, por exemplo, tripsina e papaína e outras enzimas proteolíticas e carboidrases reduzem a agregação (LUDWIG, 1998). Esse processo, também é observado com leveduras do tipo *Candida albicans*, que se aderem aos tecidos humanos, e que tem uma parede celular muito semelhante à de *Saccharomyces cerevisiae*. Enzimas como glucanases, manosil transferases e proteases podem atuar no desligamento da levedura do epitélio (KRUPPA et al, 2003). Também a adição de manose em uma suspensão de leveduras promove a completa desfloculação das células (OLIVA-NETO, 1990).

A floculação é fortemente inibida por EDTA, podendo ser superada essa desfloculação por adição de íons de cálcio a um nível residual de 10^{-8} M. Estrôncio e bário como análogos de cálcio, foram relatados como inibidores da floculação por competição (JIN e SPEERS, 1999).

2.9 Aplicações das leveduras floculantes em processos biotecnológicos

A primeira indústria a utilizar a tecnologia de leveduras floculantes foi à cervejeira. Para a indústria cervejeira a levedura floculante tem um papel importante no processo, pois facilita a remoção das células por sedimentação. A floculação apresenta outras potencialidades, podendo ser utilizada como técnica de imobilização de células em sistemas contínuos de elevada densidade celular. Além da indústria cervejeira, o estudo da utilização de leveduras floculantes tem sido aplicada na produção de etanol. A utilização de sistemas contínuos de elevada densidade celular permite a obtenção de altas produtividades em etanol. Deve ser levada em consideração para o processo a concentração de açúcar na corrente de alimentação e a capacidade de retenção de biomassa do reator, fatores estes fundamentais para a obtenção de uma elevada produtividade em etanol. O projeto do reator e o estudo das condições de operação são determinantes na eficiência de um sistema com células floculantes, permitindo modelar e manter o tamanho, forma e densidade dos flocos. Isto significa que as condições hidrodinâmicas do reator e as propriedades físicas dos flocos devem ser mantidas (FREITAS, 1996; CHOI et al., 2010).

2.10 Produção de bioetanol a partir de levedura floculante

As leveduras floculantes parecem ser bem adaptadas para a produção de produtos em grande escala, como combustíveis renováveis. Bioetanol, como um produto considerado de baixo valor, é muito sensível aos custos de produção. As indústrias de produção de bioetanol utilizam geralmente processos em batelada alimentada, as células de leveduras são geralmente removidas do vinho fermentado por centrifugação. A utilização de células floculantes, tal como um processo de auto-imobilização, é uma alternativa muito promissora, uma vez que reduz os custos associados com energia para a centrifugação e de manutenção das centrífugas, tornando o processo mais competitivo (ZHAO e BAI, 2009). A centrifugação é considerada um método relativamente caro, em relação à energia gasta por quantidade de micro-organismos recuperados (MACHADO et al., 2008). Estima-se que o uso de células de levedura floculantes permite uma economia de 16% dos custos de processamento e de 10% dos custos de instalação. Além de facilitar o processo de separação do vinho das células, as células floculantes podem ser utilizadas em reatores de alta densidade celular, o que melhora a produtividade de etanol e reduz o tempo de fermentação (ANDRIETTA, STECKELBERG, ANDRIETTA, 2008).

Algumas unidades industriais no Brasil (Usina Noroeste Paulista) e na China utilizam a tecnologia de fermentação alcoólica utilizando leveduras floculantes, em processos contínuos e após o último reator é utilizado um decantador que separa o fermento, que após o tratamento ácido é reciclado à primeira dorna (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). Esses autores denominam tal tecnologia de fermentação com alta concentração celular (Very High Gravity VHG).

2.11 Capacidade fermentativa

Andrietta, Migliari e Andrietta (1999) desenvolveram um sistema de classificação das cepas de leveduras utilizando alguns parâmetros que levam em consideração as características cinéticas, de rendimento e produtividade das linhagens (STECKELBERG, 2001; MIGLIARI, 2001).

- Coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$) – Expressa a massa celular produzida em relação à massa de substrato consumida. Este parâmetro determina a

quantidade de células que podem ser retiradas do processo para secagem ou para descarte. Excesso de produção celular indica um desvio do açúcar para a produção de células. Esta produção excedente de células pode ser utilizada para a produção de ração animal, visando assim o reaproveitamento de um subproduto gerado durante a produção de etanol.

- Coeficiente de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) – O coeficiente rendimento em etanol expressa a massa de etanol produzida em relação à massa de substrato. Este parâmetro é considerado um dos mais importantes para a indústria, pois ele determina o rendimento da fermentação alcoólica, ou seja, o potencial que a levedura tem para produzir etanol em determinada condição.

- Produtividade (\emptyset) – Este parâmetro também é muito importante na fermentação alcoólica, pois permite determinar a velocidade de transformação do substrato em etanol. A produtividade é expressa em massa de etanol produzida (g) por volume de meio (L) por unidade de tempo (h). Quanto maior for a produtividade, menor será o tempo do processo, mostrando que a levedura escolhida se adequou ao processo.

- Conversão de substrato (X_S) – Este parâmetro indica porcentagem de substrato convertido a produtos e mede a afinidade que o micro-organismo tem com o substrato, ou seja, a capacidade que o micro-organismo possui de crescer em baixas concentrações de açúcares. A unidade é expressa em % (g de substrato consumido em relação ao substrato inicial).

- Velocidade de consumo de substrato (VCS) – Este parâmetro indica a velocidade com que o micro-organismo consome o substrato disponível. Quanto maior for este parâmetro, melhor será o micro-organismo escolhido para o processo. Por outro lado, esse parâmetro não é o mais importante, pois pode estar produzindo subprodutos ao invés de etanol. Este parâmetro indica a velocidade com que a levedura consome o substrato disponível e é expressa em massa de substrato consumido (g) por volume de meio (L) e por unidade de tempo (h).

2.12 Cinética da fermentação alcoólica

Teorias e modelos cinéticos são a base para a otimização de processos, projetos e execução da planta. Segundo Andrietta, Migliari e Andrietta (1999), o conhecimento da cinética é essencial para o entendimento da dinâmica de população de leveduras nas dornas de fermentação. O intuito do estudo da cinética de processos microbianos é de quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados. A partir deste estudo pode-se compreender ainda a influencia em que fatores como pH, temperatura, agitação, inibidores e entre outros podem exercer na cinética da fermentação. É bem conhecido que o etanol é inibitório para o crescimento de células de levedura e de produção de etanol. Além disso, o etanol é um metabolito principal, cuja produção está intimamente ligada com o crescimento das células de levedura. Alguns autores pesquisaram a influencia do etanol sobre a cinética do crescimento celular como Aiba, Shoda e Nagatani (1968) que estudaram o efeito inibitório do etanol sobre a levedura e a produção de etanol em concentrações altas do mesmo. Com base nos estudos destes autores, outros pesquisadores também desencadearam uma série de estudos e propuseram modelos matemáticos que levavam em consideração a influência do etanol, como Levenspiel (1980 e 1988) que propôs uma equação não linear para levar em consideração a influência de etanol. Em meados da década de 1980, Luong (1985) salientou que a inibição do crescimento de células de levedura por etanol é não-competitivo, semelhante às reações enzimáticas que são não-competitivas. Assim, definiu um paraâmetro $P_{\text{máx}}$, que é a concentração máxima de etanol no qual o crescimento de células de levedura e produção de etanol são completamente inibidos (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). Estes autores citados não levaram em consideração a inibição pelo substrato. A inibição pelo substrato é um fenômeno comum em fermentações, e ocorre quando a concentração do substrato pode exceder um nível de tensão sobre o micro-organismo. Andrews (1968) estudou os efeitos de inibição pelo substrato em reatores batelada e contínuo e propôs o modelo com inibição pelo substrato (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

O projeto de custo-benefício do processo de produção de etanol implica na seleção das matérias-primas adequadas, e na definição da configuração do processo adequado. Para o estudo da viabilidade do processo é muito importante a realização da modelagem e simulação do processo (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007). Bailey e Ollis (1986) classificaram os modelos cinéticos em: não-estruturados e não-segregados

(células tratadas como soluto monocomponente), estruturados e não-segregados (multicomponente com composição média semelhante), não-estruturados e segregados (seres individuais distintos, multicomponentes) e, estruturados e segregados (indivíduos distintos, multicomponentes). Para o estudo da fermentação alcoólica, o modelo não-estruturado e não-segregado é o mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas (VIEGAS, 1999; PORTO, 2005).

Os modelos matemáticos que descrevem o comportamento de sistemas microbiológicos são importantes, uma vez que fornecem uma descrição matemática do mecanismo do processo e que são necessários para a otimização do mesmo. Em problemas de engenharia bioquímica, muitas vezes é necessário estimar os parâmetros do modelo de equações algébricas não-lineares ou diferenciais (VEERAMALLU e AGRAWAL, 1990; WANG e SHEU, 2000). Os modelos não estruturados de um biorreator são normalmente descritos por um conjunto de equações não-lineares diferenciais. Em contraste, os experimentos mais simples podem ser conseguidos com a fermentação em batelada. Um modelo cinético estabelecido a partir de observações de experimentos em batelada é, em geral, aplicado para avaliar a concentração de perfis de concentração celular, substrato e de produto para os processos de fermentação em batelada alimentada. Tal modelo cinético não pode ser perfeitamente aplicado e prever os perfis de concentração para um processo de fermentação em batelada alimentada. Um modelo dinâmico de processos de fermentação em batelada alimentada inclui o termo de diluição. Este efeito de diluição na fermentação em batelada alimentada provoca um efeito diferente nos micro-organismos em comparação ao realizado em batelada. Por outro lado, o modelo cinético estabelecido a partir de experimentos em batelada alimentada pode ser inadequado para prever os perfis de concentração para a fermentação em batelada (CAZZADOR e LUBENOVA, 1995, WANG e SHEU, 2000). A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que assume a presença de substrato como limitante para o crescimento. A cinética de Monod está apresentada na Equação 2.1.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad (2.1)$$

Sendo: μ a taxa de crescimento celular, μ_{\max} é a máxima taxa de crescimento celular, S a concentração do substrato limitante e K_s a constante de Monod, que representa o valor

de S no qual a taxa específica de crescimento é a metade do seu valor máximo. O modelo cinético de Aiba et al. (1968), o qual considera a inibição pelo produto, é dada pela Equação 2.2.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{(-K_P \cdot P)} \quad (2.2)$$

Sendo: K_S a constante de saturação para o crescimento celular, S a concentração de substrato no fermentador, P a concentração de produto e K_P é a constante de inibição pelo produto. Levenspiel (1980) generalizou uma equação matemática para o crescimento celular contendo um termo para inibição pelo produto, além de levar em consideração o efeito do substrato limitante (K_S), dada pela Equação 2.3.

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \quad (2.3)$$

Sendo: P_{\max} é a concentração limite do produto inibidor. Para uma concentração de P bem menor que o valor de P_{\max} , a Equação 2.3 se reduz à Equação 2.4, que é equivalente à cinética de Monod (LEVENSPIEL, 1980).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad (2.4)$$

O modelo cinético mais utilizado na fermentação alcoólica é o de Ghose e Thyagi (1979) que são consideradas algumas características no modelo como o efeito do substrato limitante (Monod), inibição pelo substrato (exponencial), inibição pelo produto (linear), conforme Equação 2.5.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (2.5)$$

O modelo de Tosetto e Andrietta (2002), conforme Equação 2.6, é semelhante ao de Ghose e Thyagi (1979), porém o valor do expoente do termo de inibição pelo produto pode assumir valores diferentes de 1.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)^n \quad (2.6)$$

Sendo: K_s a constante de saturação para o crescimento celular, K_I a constante de inibição do crescimento celular pelo substrato, $P_{m\acute{a}x}$ a concentração de produto onde cessa o crescimento do micro-organismo e n a potência do termo de inibição pelo produto.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental, bem como a metodologia empregada para cada etapa.

3.1 Material

3.1.1 Micro-organismo e meio de cultura

Inicialmente, avaliou-se seis cepas de leveduras flocculantes de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo cinco delas (C14, C19, C2/95, C2/00 e C4/00) doadas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e uma cepa doada pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), proveniente da Usina Junqueira. A cultura das leveduras foi mantida nos estados líquido e sólido. Ambas as culturas foram mantidas em refrigerador, a $7 \pm 1^\circ\text{C}$, e eram repicadas semanalmente em meio líquido e mensalmente em meio sólido.

A composição do meio de cultura utilizado nos experimentos consistiu-se de sacarose (variável para cada experimento), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L), já para o meio sólido foi utilizado o mesmo meio do estado líquido, porém com concentração de sacarose 100 g/L e concentração de Ágar-Ágar de 30 g/L (PACHECO, 2010). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção do açúcar, o qual foi substituído pela sacarose comercial.

3.1.2 Procedimento e unidade experimental

Os experimentos foram realizados em um fermentador Bioflo 110 (New Brunswick Scientific CO., NJ, USA) operado em batelada e batelada alimentada, com volume útil de 5 L, sendo este volume utilizado nas fermentações. A representação esquemática da unidade de trabalho é apresentada na Figura 3.1.

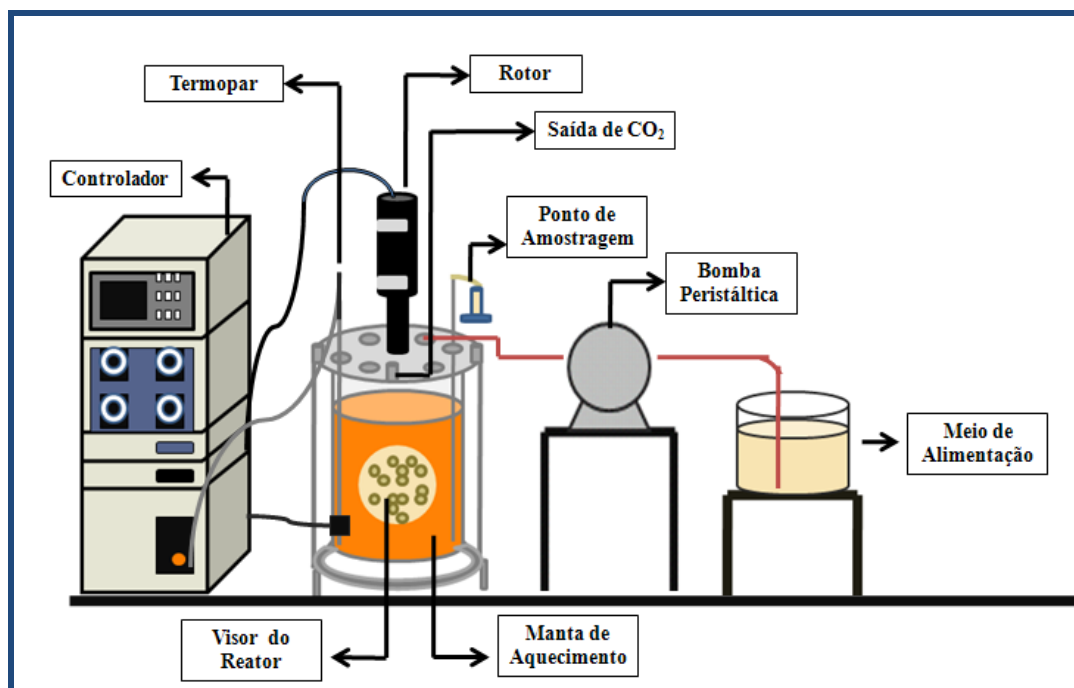


Figura 3.1 – Representação esquemática da unidade de trabalho (batelada alimentada)

Este reator é dotado de uma manta para aquecimento do meio, de forma a manter a temperatura constante durante os experimentos a $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O reator Bioflo 110 operando em batelada está apresentado na Figura 3.2.

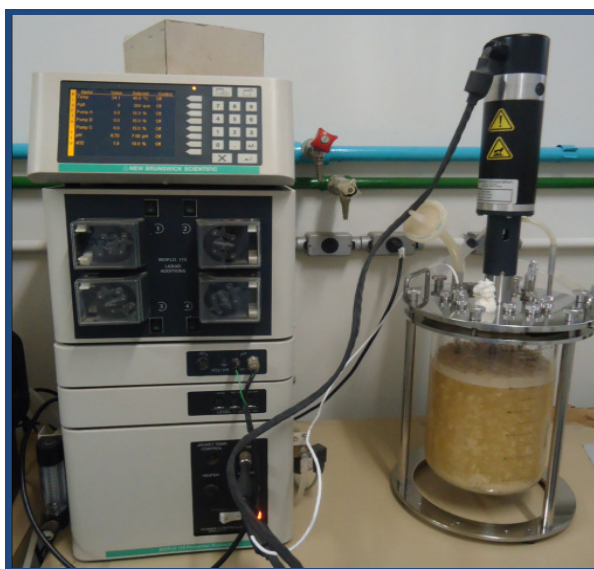


Figura 3.2 – Fermentador Bioflo 110 operando em batelada

Os experimentos no fermentador Bioflo 110 foram realizados sem agitação mecânica e o pH do meio foi ajustado apenas no início de cada fermentação em 4,5,

pela adição de H_2SO_4 . As concentrações iniciais de sacarose, células e etanol variaram para cada experimento e o volume do inóculo correspondeu a 1,5 L do reator (30% do volume total). Quando o reator foi operado em batelada alimentada, ao iniciar-se a alimentação do reator, 3,5 L de meio de cultura eram alimentados, com tempos de enchimento e concentração do substrato na alimentação (S_F) conforme experimentos propostos.

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos analíticos

3.2.1.1 Determinação da concentração celular

A concentração de biomassa foi determinada por massa seca. Uma amostra de 15 mL era retirada do reator e o sedimento celular era lavado três vezes com água destilada em um filtro a vácuo e a seguir era transferido para a estufa a 85 ± 5 °C, até massa constante. O valor da massa seca foi obtido pela diferença a massa do sedimento e a do papel de filtro (STECKELBERG, 2001).

3.2.1.2 Desfloculação

Para realizar a desfloculação da biomassa, a amostra era retirada do reator e diluída com solução desfloculante de tampão citrato 10^{-1} M a pH 3 com concentração de 5 mM de EDTA. A amostra era retirada do reator e diluída com esta solução por 30 minutos (MATSUMOTO et al., 2002).

3.2.1.3 Contagem do número inicial de células

Após a desfloculação das células, conforme item 3.2.1.2, foi realizada a contagem do número de células pela técnica de coloração de azul de metileno (JONES, 1987). Este corante apresenta coloração azul na forma oxidada, tornando-se incolor na forma reduzida. Neste método as células viáveis permanecem não coradas enquanto que as não viáveis coram de azul. O número de células viáveis foi determinado empregando câmara de Neubauer.

3.2.1.4 Contaminação bacteriana

As contagens bacteriológicas foram realizadas no início e ao final dos experimentos. A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹) foi realizada pela técnica de plaqueamento em superfície, conforme Figura 3.3 (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000), utilizando o meio de Agar para contagem (composição de acordo Anexo A1). A Nistatina, na concentração de 20 ppm foi adicionada com o intuito de inibir o crescimento de leveduras e assim possibilitar uma melhor contagem bacteriana. O procedimento constituiu-se na inoculação de uma alíquota de 0,1mL de cada diluição das amostras sobre a superfície de placas de Petri, previamente preparadas contendo ágar. O inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar, com auxílio de uma alça de Drigalski, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em posição invertida a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 48h. Foram realizados cultivos em duplicata nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} em todos os experimentos.

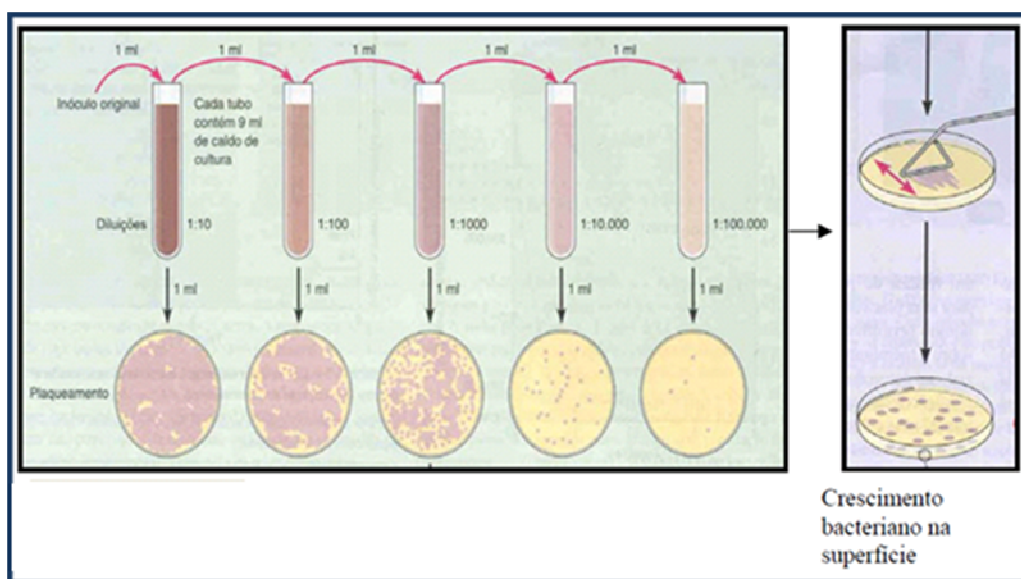


Figura 3.3 - Método de plaqueamento em superfície

Em todos os experimentos, a contaminação foi controlada pelo antibiótico comercial Kamoran, na concentração de 3 ppm (quantidade recomendada pelo fabricante), garantindo uma quantidade de bactérias inferior a 1.10^5 UFC/mL.

3.2.1.5 Determinação de açúcar e etanol

O etanol e dos açúcares totais foram quantificados pelo método de cromatografia de alta eficiência (HPLC - Cromatografia Líquida de alta eficiência). Essa técnica cromatográfica é utilizada para separar uma mistura de compostos em análises química e bioquímica com a finalidade de identificar, quantificar ou purificar os componentes individuais da mistura. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico de marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, com fluxo de bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 microlitros. Os valores obtidos nos cromatogramas foram calculados com o auxílio de curvas padrão (conforme Apêndices A1, A2, A3 e A4).

3.2.1.6 Pré-fermentação

Em alguns experimentos foi realizada uma pré-fermentação do inóculo, com o intuito de observar o comportamento da fermentação em relação à inibição que a levedura pode sofrer durante o processo fermentativo, e também simular as condições utilizadas nas usinas de produção de etanol, em que toda a célula retorna ao processo com certa quantidade de álcool inicial, principalmente quando se utiliza centrífugas para separar a levedura. Essa pré-fermentação foi realizada com o mesmo meio do item 3.1.1, porém com concentração de sacarose de 100 g/L.

3.2.2 Metodologia experimental

3.2.2.1 Seleção da levedura

Realizou-se o estudo da capacidade fermentativa, conforme proposto por Andrietta, Migliari e Andrietta (1999), das seis cepas floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* (C14, C19, C2/95, C2/00, C4/00 e CTC). A composição do meio para cultivo das leveduras consistiu-se de sacarose (180 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada cepa em frascos de erlenmeyer com volume útil de

250 mL, sendo 100 mL de cultivo estéril. As culturas crescidas nesse meio foram inoculadas nos erlenmeyers em volume correspondente a 10% de maneira que a concentração inicial de células foi de aproximadamente 1.10^8 células/mL. Os frascos foram incubados durante 24 horas em shaker à temperatura ambiente e agitação de 150 rpm. Após o tempo de incubação foram analisados o teor de sacarose, etanol e massa celular. Os cálculos utilizados para se obter os parâmetros necessários para a classificação das cepas foram:

- Coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$), conforme Equação 3.1:

$$Y_{x/s} = \frac{M_x}{M_s} \quad (3.1)$$

sendo,

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimento celular ($g_{células}/g_{substrato}$);

M_x = Massa celular produzida (g);

M_s = Massa de sacarose consumida (g).

- Coeficiente de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$), conforme Equação 3.2:

$$Y_{p/s} = \frac{M_E}{M_s} \quad (3.2)$$

sendo,

$Y_{p/s}$ = Coeficiente de rendimento em etanol ($g_{etanol}/g_{substrato}$);

M_E = Massa de etanol produzida (g);

M_s = Massa de sacarose consumida (g).

- Produtividade (\emptyset), conforme Equação 3.3:

$$\emptyset = \frac{M_E}{V_m \cdot T_f} \quad (3.3)$$

sendo,

\emptyset = Produtividade (g/L.h);

M_E = Massa de etanol produzida (g);

V_m = Volume do meio (L);

T_f = Tempo de fermentação (h).

- Conversão de Substrato (X_S), conforme Equação 3.4:

$$X_S = \frac{MS_i - MS_f}{MS_i} \cdot 100 \quad (3.4)$$

sendo,

X_S = Conversão de substrato (%);

MS_i = Massa de sacarose inicial (g);

MS_f = Massa de sacarose final (g).

- Velocidade de consumo de substrato (VCS), conforme Equação 3.5:

$$VCS = \frac{M_s}{V_m \cdot T_f} \quad (3.5)$$

sendo,

VCS = Velocidade de consumo de sacarose (g/L.h);

M_s = Massa de sacarose consumida (g);

V_m = Volume de meio (L);

T_f = Tempo de fermentação (h).

3.2.2.2 Características fenotípicas

Por meio da capacidade fermentativa verificou-se a cepa que apresentou os melhores parâmetros cinéticos e melhores características de floculação em meio, e foi

escolhida para todos os estudos subsequentes. O meio WLN (conforme Anexo A2) foi utilizado para análise da característica fenotípica desta levedura.

3.2.2.3 Concentração celular no inóculo

Foram realizados testes no reator Bioflo 110, em triplicata, variando a concentração celular da levedura C2/00 em meio fermentativo, com a finalidade de relacionar a concentração de massa seca no reator (g/L) e massa úmida (v/v) e também realizar a contagem inicial de células (células/mL). A faixa de concentração celular no inóculo estudada foi de 10,6 – 44,4% (v/v).

3.2.2.4 Influência da concentração inicial de substrato, concentração celular e do tempo de enchimento do reator operado em batelada alimentada

Uma análise pontual de uma variável não deve ser aplicada para processos fermentativos complexos, pois uma série de fatores interligados determina o comportamento do sistema. Este fato justifica a análise conjunta das variáveis propostas. Com isso, foi proposto um Planejamento Composto Central (PCC), com três variáveis e três repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos. O alfa de ortogonalidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,35313.

O objetivo deste PCC foi de analisar a influência conjunta da concentração inicial de substrato, concentração celular do inóculo e tempo de enchimento do reator batelada alimentada na fermentação alcoólica. Os experimentos foram realizados em triplicata, as amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 1,5 h e foi realizada também uma pré-fermentação, conforme item 3.2.1.6. Neste planejamento experimental a concentração celular do inóculo variou de 10,6 - 44,4% (v/v), correspondendo respectivamente a 3,18 – 13,32 % (v/v) no reator. As faixas de concentração celular e de substrato foram definidas com base em dados industriais e da literatura. Amorim (2005) e Finguerut (2006) observaram que a faixa ótima de concentração celular no reator situa-se de 10 a 13% (v/v) do reator. A faixa escolhida para concentração de sacarose variou em torno da média industrial, que é de 145 a 190 g/L de sacarose (153 a 200 g/L de açúcares redutores totais, ART). A faixa de tempo de enchimento do reator foi definida com base em dados industriais, o qual variou de 2 – 6 horas. A alimentação foi realizada por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex[®], modelo n° 7553-76). Na

Tabela 3.1 estão apresentados os valores atribuídos às três variáveis independentes no planejamento experimental, sendo a variável X_1 a concentração de sacarose (g/L), X_2 a concentração celular no inóculo % (v/v) e X_3 o tempo de enchimento do reator (h). Os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados pela Equação 3.6.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.6)$$

Sendo,

X_n = valor codificado da variável ($n = 1, 2, \dots$);

X = valor da variável a ser calculada;

X_0 = valor da variável no ponto central;

X_{+1} = valor da variável no nível superior;

X_{-1} = valor da variável no nível inferior.

As equações de codificação da concentração de sacarose (X_1), concentração celular no inóculo (X_2) e tempo de enchimento (X_3) estão apresentadas pelas Equações 3.7, 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$X_1 = \frac{(X - 167,5)}{22,5} \quad (3.7)$$

$$X_2 = \frac{(X - 27,5)}{12,5} \quad (3.8)$$

$$X_3 = \frac{(X - 4)}{2} \quad (3.9)$$

Tabela 3.1 – Matriz do Planejamento Composto Central do efeito da concentração de sacarose, concentração celular no inóculo e tempo de enchimento do reator

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	X ₁	X ₂	X ₃
	Concentração de sacarose (g/L)	Concentração celular no inóculo % (v/v)	Tempo de enchimento (h)
1	145 (-1)	15 (-1)	2 (-1)
2	145 (-1)	15 (-1)	6 (1)
3	145 (-1)	40 (1)	2 (-1)
4	145 (-1)	40 (1)	6 (1)
5	190 (1)	15 (-1)	2 (-1)
6	190 (1)	15 (-1)	6 (1)
7	190 (1)	40 (1)	2 (-1)
8	190 (1)	40 (1)	6 (1)
9	137,05 (-α)	27,5 (0)	4 (0)
10	197,95 (α)	27,5 (0)	4 (0)
11	167,5 (0)	10,6 (-α)	4 (0)
12	167,5 (0)	44,4 (α)	4 (0)
13	167,5 (0)	27,5 (0)	1,3 (-α)
14	167,5 (0)	27,5 (0)	6,7 (α)
15	167,5 (0)	27,5 (0)	4 (0)
16	167,5 (0)	27,5 (0)	4 (0)
17	167,5 (0)	27,5 (0)	4 (0)

As respostas obtidas e analisadas nesse planejamento experimental foram rendimento em etanol, produtividade e açúcar residual. O rendimento foi calculado em relação ao etanol produzido pela sacarose consumida, ao final de 10,5 horas de fermentação, pela Equação 3.10.

$$Y_{P/Sac} = \frac{C_{etanol_{10,5}} - C_{etanol_0}}{1,053 \cdot (C_{Sac_0} - C_{Sac_{10,5}})} \quad (3.10)$$

Para expressar o rendimento da produção de etanol em porcentagem, utilizou-se a Equação 3.11, que considera o rendimento teórico de 0,511 g_{etanol}/g_{ART} como 100%.

$$Rend(\%) = \frac{Y_{P/Sac.} \cdot 100\%}{0,511} \quad (3.11)$$

Sendo,

$Y_{P/Sac}$ = rendimento de etanol formado em relação a sacarose consumida (g_{etanol}/g_{sacarose});

$C_{Etanol0}$ = concentração de etanol inicial (g/L);

$C_{Etanol10,5}$ = concentração de etanol (g/L) ao final de 10,5 horas de fermentação;

C_{Sac0} = concentração de sacarose inicial (g/L);

$C_{Sac10,5}$ = concentração de sacarose (g/L) ao final de 10,5 horas de fermentação;

1,053 = fator de correção, em que 1 g de sacarose é equivalente a 1,053 g de ART.

A produtividade foi calculada em relação ao etanol produzido pelo tempo de fermentação definido em 10,5 horas, pela Equação 3.12.

$$\emptyset = \frac{C_{etanol_{10,5}} - C_{etanol_0}}{t} \quad (3.12)$$

Sendo,

\emptyset = produtividade em etanol (g/ L.h);

t = tempo de fermentação de 10,5 horas.

O açúcar residual foi calculado em concentração final de sacarose (g/L) após 10,5 horas. A escolha do tempo de 10,5 h foi devido aos resultados obtidos no PCC. Após a realização do planejamento experimental foi realizada uma análise da região ótima de trabalho pelas superfícies de respostas e efetuou-se a validação do ponto escolhido nessa região com o objetivo de testar a reprodutibilidade dos modelos obtidos.

3.2.2.5 Estudo da recirculação de células e concentração inicial de etanol na fermentação alcoólica

Após a realização do Planejamento Composto Central, escolheu-se a melhor região em que se obteve os resultados selecionados de rendimento em etanol e produtividade pelas variáveis estudadas (concentração de sacarose em g/L, concentração celular em % (v/v) e tempo de enchimento do reator em h). A partir dos resultados definiu-se o ponto otimizado para as variáveis em 170 g/L de concentração de sacarose (pesou-se 850g de sacarose e dissolveu-se em 3,5 L formando a solução de alimentação (S_F) com 242,86 g/L de sacarose, a ser alimentada ao inóculo de volume 1,5 L), concentração celular do inóculo de 40 % (v/v) e tempo de enchimento de 6 horas. O processo apresentou um bom rendimento e produtividade, porém o açúcar residual após 10,5 horas de fermentação mostrou-se alto. A partir destes resultados realizaram-se alguns experimentos, em duplicata, com o intuito de diminuir o açúcar residual ao final da fermentação alcoólica, mantendo o rendimento e a produtividade próximos aos encontrados. A fim de melhorar o desempenho do processo e aumentar a mistura no reator, foi utilizada uma recirculação externa das células, o qual era retirado o meio fermentativo do fundo do reator por uma bomba peristáltica (Masterflex[®], modelo n° 7553-76) e alimentado pela tampa do reator, durante a fermentação, com vazão de 10 mL/s. Os experimentos realizados estão descritos a seguir com suas respectivas condições de processo. Todos os experimentos foram realizados na temperatura de $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e o pH ajustado apenas no início da fermentação em 4,5. Os Experimentos A e B foram realizados com o objetivo de analisar o efeito da recirculação de meio fermentativo na produtividade e no tempo de fermentação.

Experimento A: Este experimento foi realizado com a pré-fermentação, conforme item 3.2.1.6., nas condições do ponto ótimo do PCC. Neste experimento foi iniciado a recirculação do meio fermentativo após as 6 horas de enchimento, com vazão de 10 mL/s. O meio foi preparado pesando-se os nutrientes e a sacarose para 5 L, porém dissolvidos em 3,5 L. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 62,41 g/L (cerca de 18,72 g/L de etanol inicial, considerando uma batelada);
- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 0 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 40%;

- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 242,86 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)= 0,583 L/h.

Experimento B: O experimento B foi realizado nas mesmas condições do experimento A, porém a recirculação foi realizada durante todo o processo de fermentação alcoólica, com vazão de 10 mL/s. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 63,68 g/L (cerca de 19,1 g/L de etanol inicial, considerando uma batelada);
- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 0 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 40%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 242,86 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)= 0,583 L/h.

Os experimentos C, D e E foram realizados com o objetivo de analisar a influência da presença de etanol no inóculo, sendo que o mesmo pode atuar como inibidor do crescimento da levedura na fermentação alcoólica. Outro ponto estudado nestes experimentos foi a concentração de sacarose inicial no inóculo, sendo analisado as respostas rendimento em etanol, produtividade e sacarose residual.

Experimento C: Para o experimento C foi realizado o mesmo procedimento do experimento A, porém antes de iniciar o enchimento do reator era retirado o sobrenadante (o qual continha álcool proveniente da pré-fermentação) e a massa celular que estava decantada no fundo do reator era mantida. Após a retirada do sobrenadante as células eram lavadas com água destilada para retirada do etanol residual e adicionado meio com substrato até completar o volume de 1,5 L do reator, formando assim o inóculo. O meio para este experimento foi preparado pesando-se os nutrientes e a sacarose para 5 L, porém dissolvidos em 4,4 L. O reator contendo as células foi preenchido com 0,9 L deste meio até completar 1,5 L do reator e após iniciou-se o processo fermentativo. A recirculação foi realizada durante todo o processo de fermentação alcoólica, com vazão de 10 mL/s. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 0 g/L;

- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 115,91 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 40%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 193,18 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)= 0,583 L/h.

Experimento D: O experimento D seguiu o mesmo procedimento do experimento C, porém o processo fermentativo começou apenas com as células decantadas no fundo do reator. O meio preparado de 4,4 L foi adicionado durante o tempo de enchimento de 6 h e a recirculação iniciou-se após o reator atingir 1,5 L de volume, com vazão de 10 mL/s.

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 0 g/L;
- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 0 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 40%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 193,18 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)= 0,733 L/h.

Os experimentos E, F e G foram realizados com o objetivo de analisar a influência do aumento da concentração celular no inóculo para melhoramento da produtividade e diminuição do tempo de fermentação. Com o aumento da concentração celular do inóculo foi estudado no Experimento F a diminuição do tempo de enchimento do reator operando em batelada alimentada com o intuito de aumentar a produtividade. Para o experimento G o objetivo foi analisar o rendimento, aumentando a variável concentração de sacarose inicial.

Experimento E: O experimento E foi realizado utilizando os mesmos procedimentos do experimento C, porém quando o sobrenadante foi retirado do inóculo não foi adicionado meio com substrato, mas sim água destilada. O meio utilizado para enchimento do reator foi preparado pesando-se os nutrientes e a sacarose para 5 L, porém dissolvidos em 3,5 L. A recirculação foi realizada durante todo o processo de fermentação alcoólica, com vazão de 10 mL/s. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 0 g/L;

- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 0 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 40%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 242,86 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)= 0,583 L/h.

Experimento F: O experimento F foi baseado no experimento C, porém a concentração celular utilizada no inóculo foi maior. O meio para este experimento foi preparado pesando-se os nutrientes e a sacarose para 5 L, porém dissolvidos em 4,25 L. O reator contendo as células foi preenchido com 0,75 L deste meio até completar 1,5 L do reator e após iniciou-se o processo fermentativo. A recirculação foi realizada durante todo o processo de fermentação alcoólica, com vazão de 10 mL/s. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 0 g/L;
- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 100 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 50%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 200 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)= 0,583 L/h .

Experimento G: O experimento G seguiu o mesmo procedimento do experimento F, utilizando a mesma concentração celular, entretanto foi utilizado um tempo de enchimento menor. O meio para este experimento foi preparado pesando-se os nutrientes e a sacarose para 5 L, porém dissolvidos em 4,25 L. O reator contendo as células foi preenchido com 0,75 L deste meio até completar 1,5 L do reator e após iniciou-se o processo fermentativo. A recirculação foi realizado durante todo o processo de fermentação alcoólica, com vazão de 10 mL/s. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 0 g/L;
- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 100 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 50%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 170 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 200 g/L;

- Tempo de enchimento (t)= 4 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)=0,875 L/h.

Experimento H: O experimento H foi realizado nas condições do experimento F. A diferença deste experimento foi a utilização de uma concentração maior de substrato. O meio para este experimento foi preparado pesando-se os nutrientes e a sacarose para 5 L, porém dissolvidos em 4,25 L. O reator contendo as células foi preenchido com 0,75 L deste meio até completar 1,5 L e após iniciou-se o processo fermentativo. A recirculação foi realizado durante todo o processo de fermentação alcoólica, com vazão de 10 mL/s. As condições do experimento foram:

- Concentração de etanol no inóculo (E_0)= 0 g/L;
- Concentração de sacarose no inóculo (S_0)= 129,41 g/L;
- Concentração celular no inóculo (X_0)= 50%;
- Concentração de sacarose no reator, considerando uma batelada (S)= 220 g/L;
- Concentração de sacarose na alimentação (S_F)= 258,82 g/L;
- Tempo de enchimento (t)= 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato (F)=0,583 L/h.

3.2.2.6 Cinética da fermentação alcoólica e modelagem matemática

O reator operado em batelada alimentada é muito utilizado em processos fermentativos, pois permite a manutenção de baixos níveis de substrato por longos períodos de tempo, que é favorável a estimação de parâmetros cinéticos, também permite manter a concentração celular constante e controlar velocidades de crescimento em condições transientes. Além disso, há evidências que as máximas velocidades de alguns processos podem ser encontradas somente nestas circunstâncias (BORZANI et al., 2001).

O processo fermentativo em batelada alimentada é conduzido em duas etapas. Na primeira etapa o cultivo é operado em batelada alimentada. Inicia-se com o inóculo que corresponde cerca de 30% do volume da dorna, sendo o meio alimentado a vazão constante ou linear com o tempo até o enchimento do reator. A partir desse enchimento inicia-se a segunda etapa, operando apenas em batelada até o consumo total dos açúcares fermentescíveis. Na etapa inicial, quando o experimento está sendo operado em batelada alimentada a realização da modelagem se torna difícil, pelo fato dos

modelos encontrados na literatura não se ajustarem bem aos dados experimentais. Isso se deve à alimentação ao reator, no qual ocorre inicialmente consumo do substrato ao mesmo tempo que ocorre a formação do produto, sem se observar o crescimento celular que se inicia após um tempo de alimentação de meio. Na etapa final, na qual se opera em batelada, o comportamento da fermentação alcoólica, como crescimento celular, consumo de substrato e geração de produto é explicado pelos modelos matemáticos clássicos (AMORIM, 2005; DARÉ, 2008).

O modelo cinético utilizado neste trabalho foi o modelo não estruturado desenvolvido por Ghose e Thyagi (1979), e modificado por Tosetto e Andrietta (2002) em que o valor do expoente do termo de inibição pelo produto pode assumir valores diferentes de 1 e considera -se a inibição pelo substrato e pelo produto.

3.2.2.6.1 Modelo para a fermentação alcoólica em processo batelada

Um experimento em processo batelada foi realizado para a estimação de alguns parâmetros que mais tarde, foram utilizados na modelagem do reator batelada alimentada. Neste experimento foi realizada a pré-fermentação (conforme item 3.2.1.6) do inóculo. O experimento em batelada procedeu nas condições de 160 g/L de concentração inicial de sacarose, 4% (v/v) de concentração celular no reator (cerca de 13,33% (v/v) concentração no inóculo), sem agitação a $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e pH inicial de 4,5. O modelo para a fermentação no processo em batelada é descrito pelo balanço de massa para células, conforme Equação 3.13, balanço de massa para substrato Equação 3.14, balanço de massa para produto Equação 3.15 e o modelo de Tosetto e Andrietta (2002) Equação 3.16.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3.13)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S}} \mu X - M_s X \quad (3.14)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{p/S}}{Y_{x/S}} \mu X + bX \quad (3.15)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad (3.16)$$

Sendo,

X = concentração de células (g/L);

S = concentração de sacarose (g/L);

P = concentração de etanol (g/L);

t = tempo (h);

$Y_{p/S}$ = rendimento em etanol (gs/g_P);

$Y_{x/S}$ = rendimento em células (gs/g_X);

μ = taxa de crescimento celular (h⁻¹);

μ_{\max} = taxa máxima específica de crescimento celular (h⁻¹);

K_S = constante de saturação para o crescimento celular (gs/L);

K_i = constante de inibição do crescimento celular pelo substrato (gs/L);

P_{\max} =concentração de produto na qual cessa o crescimento do micro-organismo (g/L);

n = a potência do termo de inibição pelo produto;

M_S = a constante de manutenção celular (g/L.h);

b = produção de etanol não associado ao crescimento (g/L.h).

3.2.2.6.2 Validação do modelo para a fermentação alcoólica em processo batelada alimentada com e sem recirculação

Os experimentos em batelada alimentada foram realizados nas condições da região otimizada do Planejamento Composto Central, com concentração de sacarose de 170 g/L, tempo de enchimento em 6 horas a 32°C ± 0,5, sem agitação e pH inicial em 4,5. O experimento realizado sem recirculação iniciou com concentração celular no reator de 12% (v/v) (cerca de 40% (v/v) de concentração no inóculo), com etanol e sem substrato inicial no inóculo. Já para o experimento com recirculação, a concentração celular no reator foi de 15% (v/v) (50% (v/v) no inóculo), sem etanol e com sacarose inicial no inóculo. No experimento com recirculação o meio foi recirculado através de uma bomba peristáltica (Masterflex[®], modelo n° 7553-76) com vazão de 10 mL/s. O modelo da fermentação no processo em batelada alimentada, para os experimentos com

e sem recirculação, é descrito pelas Equações 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23.

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{F_a}{V} X + \mu X \quad (3.17)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_a}{V} (S_F - S) - \sigma X \quad (3.18)$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{F_a}{V} P + \pi X \quad (3.19)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_a \quad (3.20)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad (3.21)$$

$$\sigma = \left(\frac{1}{Y_{x/S}} \mu + M_S \right) \quad (3.22)$$

$$\pi = \left(\frac{Y_{p/S}}{Y_{x/S}} \mu + bX \right) \quad (3.23)$$

Sendo,

F_a = vazão de alimentação de substrato (L/h);

V = volume de trabalho do fermentador (L);

S_F = concentração de sacarose na alimentação (g/L);

σ = contribuição de substrato para o crescimento e manutenção celular (h^{-1});

M_S = a constante de manutenção celular (g/L.h);

π = formação de produto associado e não-associado ao crescimento (h^{-1}).

3.2.2.6.3 Ajustes dos parâmetros cinéticos

Os valores dos parâmetros foram gerados pela técnica de regressão não linear aplicada aos dados experimentais obtidos pela validação nas condições definidas pelas superfícies de resposta e curvas de contorno ($X_0 = 13,33 \%$ (v/v) de células no inóculo e $S_0 = 160 \text{ g/L}$) utilizando um algoritmo multirresposta (MARQUARDT, 1963). A integração do conjunto de equações diferenciais do modelo foi realizada utilizando o algoritmo de quarta-ordem de Runge-Kutta (GILL, 1951). Os resíduos entre os valores experimentais e calculados pelo modelo foram obtidos pela minimização da soma dos quadrados dos resíduos

A validação realizada para os experimentos em batelada alimentada e batelada alimentada com recirculação foram realizadas utilizando o método de Runge-Kutta (GILL, 1951).

3.2.2.7 Estudo da produção máxima de etanol na fermentação alcoólica ($P'_{\text{máx}}$)

O objetivo da determinação de $P'_{\text{máx}}$ foi quantificar a máxima concentração de etanol que a levedura C2/00 foi capaz de produzir durante o processo de fermentação alcoólica, até que o etanol formado começasse a inibir a levedura, cessando assim a formação de mais produto. Foi realizado um experimento em duplicata, em reator batelada alimentada de 5 L com volume de meio de 2 L, sendo o meio utilizado conforme item 3.1.1, com concentração de sacarose de 180 g/L e concentração celular no reator de 12% (v/v) (correspondendo a 40 % (v/v) no inóculo).

Quando a concentração de sacarose no meio em fermentação atingia valores menores que 10 g/L, era adicionado ao reator 0,1 L de uma solução formada de sacarose e dos demais nutrientes que compõe o meio fermentativo, conforme Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Massa de sacarose adicionada ao meio em função do tempo de fermentação

Tempo de Fermentação (h)	Massa de Sacarose (g)
15	73,5
20	77
27	80,5
30	84
41	87,5
60	91

3.2.2.8 Concentração máxima de etanol em que cessa o crescimento microbiano (P_{máx})

Este estudo teve como objetivo analisar a concentração máxima de produto, onde cessa o crescimento microbiano, sendo assim submetida a diferentes concentrações de produto. O meio de cultivo utilizado foi YEPD, sendo adicionando etanol absoluto nas concentrações finais de 0; 3; 6; 9; 12; 12,5; 13; 13,5; 14; 14,5; 15; 18 e 21% (v/v), ao meio liquefeito a temperatura de 50 a 55°C. Após a solidificação a placa foi envolvida com papel filme. A levedura foi transferida para um tubo contendo solução salina e foi realizada a contagem celular (células/mL) pela técnica de contagem em câmara de Neubauer. Esta suspensão foi ajustada para 1×10^8 células/mL e desta foram retirados 10 µL que foram cuidadosamente depositados na superfície do meio YEPD com diferentes concentrações de etanol. As placas foram incubadas a 30°C por 4 dias.

3.2.2.9 Estudo da velocidade específica de sedimentação da levedura C2/00

O pH inicial utilizado nas fermentações alcoólicas deste trabalho foi de 4,5. Este pH foi escolhido por meio de testes preliminares, em que se observou maior rendimento na fermentação. O estudo da sedimentação da levedura foi realizado em diferentes valores de pH com o objetivo de verificar em qual pH que a levedura apresenta maior velocidade de sedimentação. Os valores de pH estudados foram 3; 4; 5; 6 e 7.

Os experimentos foram realizados em triplicada e conduzidos em erlenmayer de 500 mL, sendo 300 mL de meio fermentativo. O meio utilizado foi conforme item 3.1.1, com concentração de sacarose de 170 g/L. A concentração celular foi de 15 % (v/v) em relação ao volume do meio fermentativo. O tempo de fermentação foi de 15 horas à temperatura ambiente e agitação de 100 rpm. Após a fermentação foram retirados alíquotas de 30 mL do vinho fermentado e centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos. O precipitado formado foi ressuspensionado duas vezes em água destilada e novamente centrifugado. O pH da água destilada foi ajustado para cada experimento, com HCl 0,5 M e NaOH 0,5 M. Posteriormente foi retirado um grama de precipitado e diluído em 100 mL de água destilada com seu respectivo pH ajustado. Esta diluição sofreu forte agitação e rapidamente foi colocada na cubeta do espectrofotômetro e assim acompanhada a absorbância, durante 10 minutos, com leituras de 30 em 30 s, empregando um comprimento de onda de 600 nm. A velocidade específica de sedimentação (VES) foi calculada pela Equação 3.24 (VIEGAS, 1999; VIEGAS, 2003):

$$VES = \frac{1 - \left(\frac{Abs_t}{Abs_0} \right)}{t - t_0} \quad (3.24)$$

VES = Velocidade específica de sedimentação;

Abs_0 = Absorbância no tempo inicial t_0 ;

Abs_t = Absorbância medido no tempo t .

3.2.2.9.1 Estudo em proveta da sedimentação da levedura em pH 5

Após a realização da fermentação do Experimento F (o qual utilizou a recirculação de meio fermentativo), após consumo total da sacarose foi realizado um experimento para avaliar a sedimentação em pH 5. O vinho fermentado, com concentração celular no reator de 15% (v/v), após homogeneização foi retirado do reator e colocado em uma proveta de 500 mL. O vinho contido na proveta foi homogeneizado e após foi realizada a leitura da altura da interface da sedimentação em função do tempo.

3.3 Fluxograma representativo de todas as etapas realizadas nesse trabalho

Na Figura 3.4 está apresentado o fluxograma com todas as etapas realizadas neste trabalho, com o intuito de melhorar o entendimento de como o trabalho avançou durante a pesquisa.

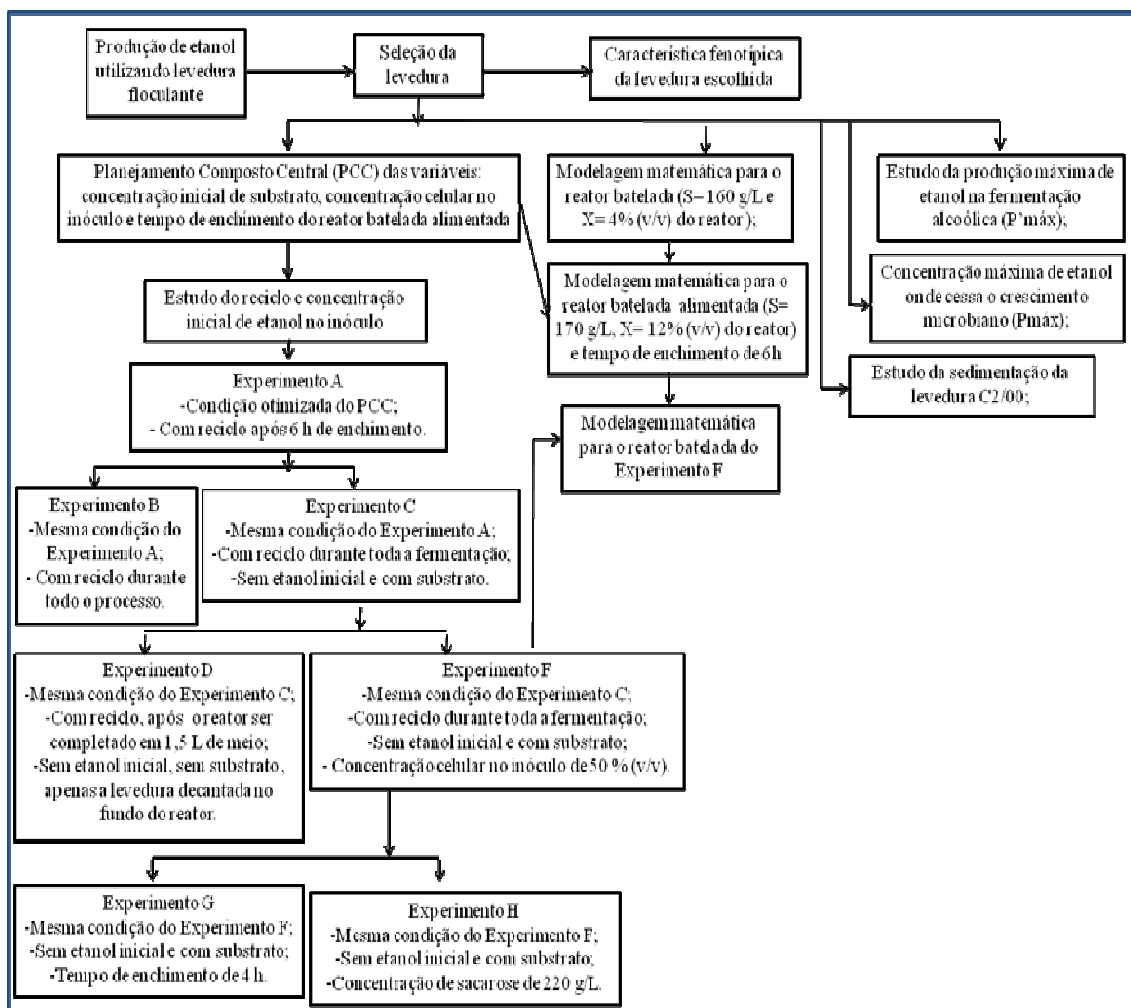


Figura 3.4 – Fluxograma representativo das etapas realizadas no trabalho

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão da escolha da cepa, pela avaliação da capacidade fermentativa. Posteriormente é apresentado o estudo da influência conjunta das variáveis concentração inicial de sacarose, concentração celular no inóculo e tempo de enchimento do reator batelada alimentada. Na sequência do estudo do trabalho são descritos os testes para melhoria do processo fermentativo, sendo eles: uso da recirculação de células, alterações de concentração de sacarose e etanol no inóculo. E para finalizar são apresentados os resultados da modelagem matemática do reator batelada, batelada alimentada e batelada alimentada com recirculação de células e completando com o estudo da produção máxima de etanol ($P'_{\text{máx}}$), concentração de produto em que cessa o crescimento microbiano ($P_{\text{máx}}$) e estudo da sedimentação da levedura com características floculantes.

4.1 Avaliação da capacidade fermentativa

O desempenho das leveduras no processo fermentativo nas indústrias é apontado como a única metodologia capaz de realizar a distinção definitiva entre diferentes cepas (CAMPBELL, 1999). A metodologia para determinação da capacidade fermentativa é baseada principalmente em dados cinéticos e de rendimento. Durante este estudo pôde-se observar que apesar de todas as cepas utilizadas apresentarem características floculantes, nem todas formaram flocos, algumas delas formaram flocos pequenos ou não formaram flocos durante o processo fermentativo. Pela Figura 4.1 pode-se observar o comportamento de cada levedura estudada. Para a cepa denominada C19 foi observado uma mistura homogênea com o meio (sem formar flocos) e sua sedimentação foi bastante lenta. Já para as cepas C14 e C2/95 observou-se a formação de flocos menores. Observou-se que as cepas C2/00 e C4/00 formaram flocos grandes e a sedimentação foi rápida. A cepa do CTC, proveniente da Usina Junqueira, não formou flocos definidos, porém a sua sedimentação foi um pouco inferior a C2/00. Alguns estudos apontam uma sedimentação melhor, para flocos com dimensões maiores e estes

estudos mostraram também, que um aumento da intensidade de agitação provoca uma diminuição no tamanho dos flocos (DOMINGUES, LIMA e TEIXEIRA 2005).

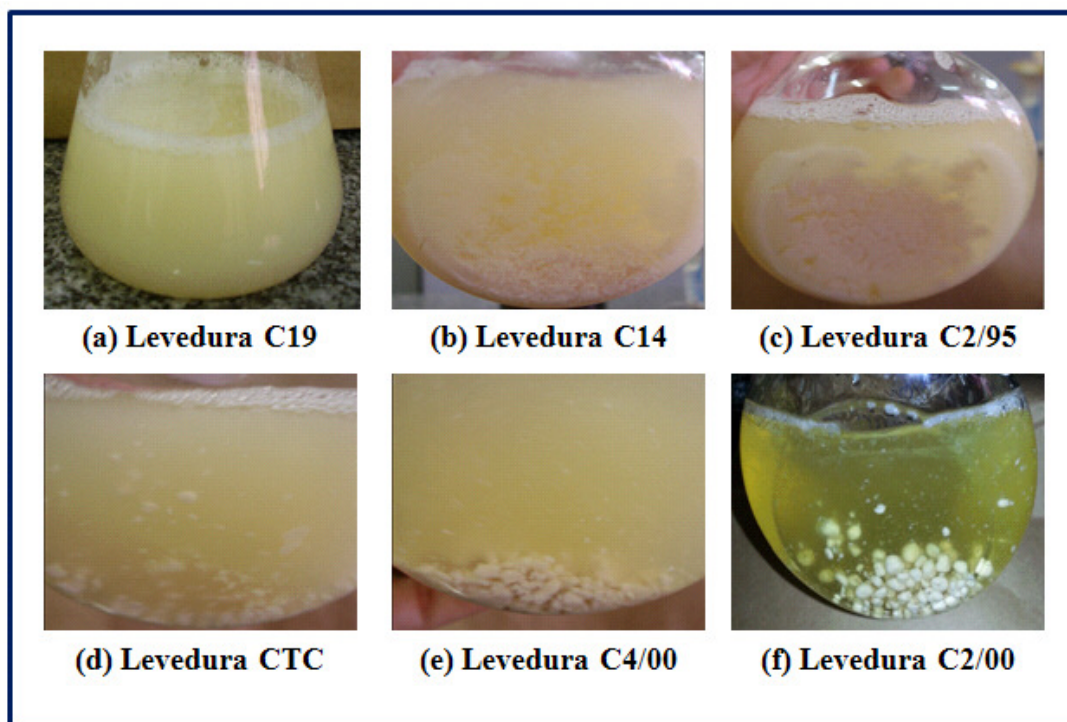


Figura 4.1 – Comportamento das leveduras em meio fermentativo, (a) C19, (b) C14, (c) C2/95, (d) CTC, (e) C4/00 e (f) C2/00

A Tabela 4.1 apresenta os resultados dos parâmetros obtidos para cada cepa testada. Os melhores resultados de velocidade de consumo de substrato e nível de conversão de substrato foram obtidos pelas cepas C2/95 e C2/00, como mostra a Tabela 4.1. Analisando os resultados para o coeficiente de rendimento celular $Y_{X/S}$ verifica-se que a cepa C14 apresentou um nível maior de coeficiente de rendimento quando comparado aos obtidos para as outras cepas. Esses valores altos de coeficiente de rendimento celular indicam um maior desvio de açúcar para a produção de células em detrimento à produção de etanol. Em casos nas quais existem unidades de secagem de células, esta produção excedente pode ser aproveitada na produção de ração animal, minimizando o prejuízo (STECKELBERG, 2001).

A cepa que apresentou melhores resultados em rendimento em etanol e produtividade foi à cepa C2/00, apresentando o maior coeficiente de rendimento $Y_{P/S}$. Os parâmetros de rendimento em etanol e produtividade são considerados os mais

importantes para a indústria alcooleira. Quanto maiores forem os parâmetros de produtividade e rendimento melhor será a levedura para o processo (MIGLIARI, 2001).

Tabela 4.1 – Parâmetros cinéticos, de rendimento e produtividade obtidos para cada cepa

	CTC	C14	C19	C2/95	C2/00	C4/00
$Y_{p/s}$	0,43	0,44	0,37	0,41	0,50	0,43
(g_p/g_s)	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$
$Y_{x/s}$	0,036	0,052	0,037	0,040	0,044	0,036
(g_x/g_s)	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$
PROD	2,98	2,94	2,20	3,01	3,60	2,98
($g_p/L.h$)	$\pm 0,07$	$\pm 0,02$	$\pm 0,11$	$\pm 0,15$	$\pm 0,14$	$\pm 0,07$
VCS	7,00	6,72	5,93	7,39	7,21	7,00
($g_s/L.h$)	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,04$
X_S	92,35	90,59	79,55	98,58	96,22	92,35
(%)	$\pm 0,53$	$\pm 0,83$	$\pm 0,50$	$\pm 0,52$	$\pm 0,73$	$\pm 0,53$

Com os resultados obtidos de capacidade fermentativa, pode-se concluir que a cepa floculante *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, cedida pelo CPQBA, foi considerada a levedura mais apta para o processo de fermentação alcoólica. Esta cepa apresentou de uma forma geral, os melhores resultados de rendimento em etanol e produtividade, bons resultados de velocidade de consumo de substrato e conversão de sacarose quando comparado as outras cepas. Além disso, a levedura C2/00 apresentou excelentes características de floculação. A levedura C2/00 foi utilizada para o estudo subsequente desse trabalho.

4.2 Características fenotípicas da levedura C2/00

Durante a etapa de isolamento desenvolvida em placas de Petri com meio YEPD, estudou-se a morfologia da colônia formada. Pela Figura 4.2 pode-se notar que a levedura C2/00 apresentou colônia mucosa (lisa). Na literatura é observado que as leveduras floculantes geralmente apresentam colônia rugosa (células em cacho). Segundo Reis (2011), as linhagens com colônias rugosas apresentam velocidade de

fermentação mais lenta e capacidade fermentativa inferior às linhagens com colônias mucosas de *S. cerevisiae*.

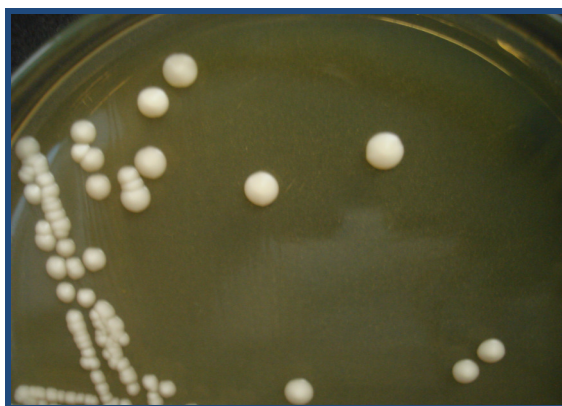


Figura 4.2 – Morfologia lisa da cepa C2/00

4.3 Concentração celular no inóculo

Na Tabela 4.2 é apresentada a relação entre a concentração celular do inóculo expressa em % (v/v) em massa úmida e sua respectiva massa seca em g/L no reator (volume de 5L). Esta relação de massa seca por volume de inóculo ficou muito próxima da relação encontrada por Pacheco (2010), que também utilizou outra variedade com características floculantes. Os resultados obtidos por Pacheco (2010) foram: 10 - 45 % (v/v) de massa úmida no inóculo para 9,5 – 42,75 g/L de massa seca no reator.

Tabela 4.2 – Relação entre concentração celular no inóculo e respectiva massa seca no reator

Concentração celular % (v/v) no inóculo de 1,5 L	Massa seca no reator (g/L) em 5L
10,6	12,15 ± 0,55
15	14,33 ± 1,32
27,5	25,57 ± 1,65
40	35,96 ± 1,77
44,4	38,21 ± 1,68

4.4 Influência da concentração inicial de substrato, concentração celular no inóculo e de tempo de enchimento do reator batelada alimentada

No Planejamento Composto Central (PCC) estudou-se as variáveis que afetam fortemente o desempenho da fermentação alcoólica, como a influência da concentração inicial de substrato X_1 (137,05 – 197,95 g/L), concentração celular no inóculo X_2 (10,6 – 44,4 %) e o tempo de enchimento do reator X_3 (1,3 – 6,7 h). Em todos os experimentos foram realizadas as contagens iniciais de células vivas no reator, correspondendo a um volume de 5 L. Essa contagem apresenta valores de aproximadamente $7 \cdot 10^7$ células /mL para 10,6 % (v/v), $9 \cdot 10^7$ células /mL para 15 % (v/v), $2 \cdot 10^8$ células /mL para 27,5 % (v/v), $3 \cdot 10^8$ células /mL para 40 % (v/v) e $3 \cdot 10^8$ células /mL para 44,4 % (v/v). A Tabela 4.3 mostra os valores codificados e reais das variáveis de estudo e as respostas rendimento em relação ao valor teórico, produtividade em etanol e sacarose residual.

Todas estas variáveis foram analisadas durante 10,5 horas de processo fermentativo. Este tempo de fermentação é justificado pelo Experimento 9, o qual mostra que decorrido 10,5 horas de processo fermentativo, o açúcar praticamente havia sido consumido, sobrando apenas 6,12% em relação ao inicial. Além disso, tempos maiores podem comprometer os valores de produtividade obtidos na fermentação. Dessa forma foi justificado a análise dos resultados no referido tempo. Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas, indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Neste planejamento experimental foi considerado um nível de significância de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,05$. Com os resultados apresentados na Tabela 4.3, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica*® 7.0.

Tabela 4.3 – Variáveis utilizadas no PCC e suas respectivas respostas em 10,5 horas de fermentação

Experimentos	Valor Codificado (Valor Real)					Sacarose Residual (g/L)
	X ₁ (g/L)	X ₂ (%) no inóculo	X ₃ (h)	Rendimento (%)	Produtividade (g _{etanol} /L.h)	
1	-1 (145)	-1 (15)	-1 (2)	85,73	4,99	31,18
2	-1 (145)	-1 (15)	+1 (6)	93,87	4,27	56,32
3	-1 (145)	+1 (40)	-1 (2)	89,09	5,3	31,99
4	-1 (145)	+1 (40)	+1 (6)	90,23	5,39	28,33
5	+1 (190)	-1 (15)	-1 (2)	77,19	4,2	83,84
6	+1 (190)	-1 (15)	+1 (6)	85,11	3,29	114,48
7	+1 (190)	+1 (40)	-1 (2)	88,23	6,18	53,33
8	+1 (190)	+1 (40)	+1 (6)	90,79	6,03	60,39
9	- α (137,05)	0 (27,5)	0 (4)	84,48	5,57	8,39
10	+ α (197,95)	0 (27,5)	0 (4)	82,71	5,87	59,44
11	0 (167,5)	- α (10,6)	0 (4)	87,50	3,28	94,42
12	0 (167,5)	+ α (44,4)	0 (4)	90,64	6,05	37,27
13	0 (167,5)	0 (27,5)	- α (1,3)	85,45	6,47	19,69
14	0 (167,5)	0 (27,5)	+ α (6,7)	90,52	5,59	52,02
15	0 (167,5)	0 (27,5)	0 (4)	86,81	6,17	29,76
16	0 (167,5)	0 (27,5)	0 (4)	86,62	6,12	31,13
17	0 (167,5)	0 (27,5)	0 (4)	86,93	5,97	33,44

4.4.1 Análise dos resultados obtidos para a resposta rendimento em etanol das variáveis estudadas

A partir dos resultados obtidos, mostrados na Tabela 4.3, analisou-se estatisticamente o comportamento da resposta rendimento. Dessa forma, determinou-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações, conforme Tabela 4.4, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.4 – Resultados da regressão múltipla para a resposta rendimento com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo Independente	86,61150	0,000000
X₁ (L)	-1,71456	0,001643
X₁ (Q)	-1,52493	0,012370
X₂ (L)	1,77468	0,001354
X₂ (Q)	1,46797	0,014761
X₃ (L)	2,28268	0,000304
X₃ (Q)	0,87273	0,097300
X₁X₂	2,12500	0,001418
X₁X₃	0,15000	0,730044
X₂X₃	-1,54500	0,007659
	R ² = 0,96	

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.1 completa com todos os parâmetros significativos e não significativos:

$$Y_{\text{Rendimento}} = 86,61150 - 1,71456X_1 - 1,52493X_1^2 + 1,77468X_2 + 1,46797X_2^2 + 2,28268X_3 + 0,87273X_3^2 + 2,12500X_1X_2 + 0,15000X_1X_3 - 1,54500X_2X_3 \quad (4.1)$$

Observa-se na Tabela 4.4 que as variáveis significativas do modelo foram: concentração de sacarose em seu termo linear X₁ (L) e quadrático X₁ (Q), concentração celular do inóculo em seu termo linear X₂ (L) e quadrático X₂ (Q), tempo de enchimento do reator apenas em seu termo linear X₃ (L) e as interações concentração de sacarose/concentração celular no inóculo (X₁X₂) e concentração celular no inóculo/tempo de enchimento (X₂X₃). Após a eliminação dos parâmetros não significativos, que foram X₃ (Q) e a interação X₁X₃, com p > 0,05, foram obtidos os seguintes parâmetros, conforme Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Resultados da regressão múltipla para a resposta rendimento, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo Independente	87,20982	0,000000
X₁ (L)	-1,71456	0,001432
X₁ (Q)	-1,52493	0,013722
X₂ (L)	1,77468	0,001144
X₂ (Q)	1,46851	0,016563
X₃ (L)	2,28268	0,000196
X₁X₂	2,12500	0,001206
X₂X₃	-1,54500	0,008140
R ² = 0,94		

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 4.2.

$$Y_{\text{Rendimento}} = 87,20982 - 1,71456X_1 - 1,52493X_1^2 + 1,77468X_2 + 1,46851X_2^2 + 2,28268X_3 + 2,12500X_1X_2 - 1,54500X_2X_3 \quad (4.2)$$

Pela Equação 4.2, pode-se notar uma considerável influência da variável X₃ no aumento do rendimento, o qual indica que a utilização de um maior tempo de enchimento do reator implica em um maior rendimento. O mesmo acontece com a variável X₂, ainda que com um menor efeito que a variável X₃, mostra que para uma maior concentração celular no inóculo, maior será o rendimento obtido. Já para a variável X₁, o sinal negativo indica que na condição de maior concentração de sacarose, menores serão os valores de rendimento em etanol obtidos.

O coeficiente de correlação (R²) obtido após o ajuste foi de 0,94, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção do rendimento, mostrando que 94% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. A Figura 4.3 ilustra os valores preditos em função dos observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

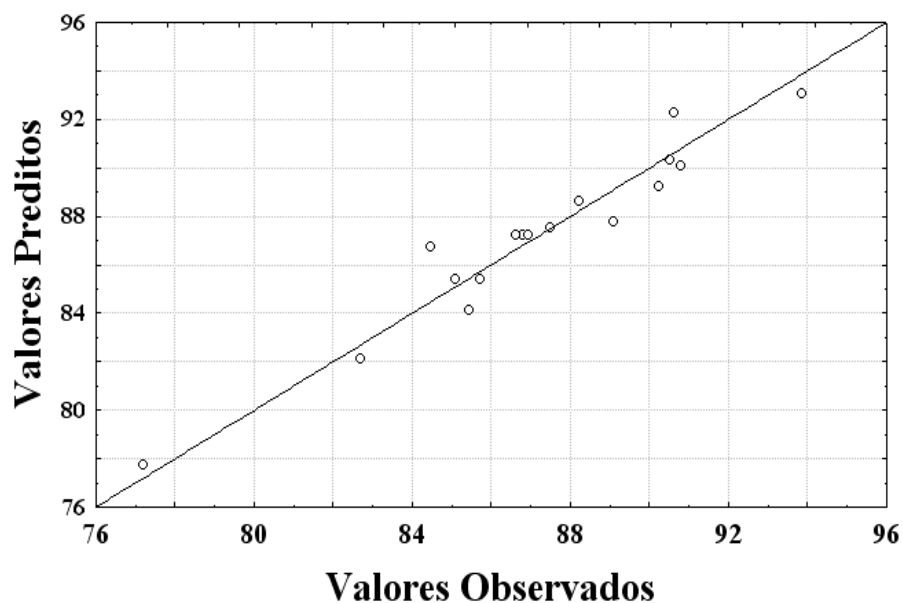


Figura 4.3 - Valores preditos em função dos observados em relação ao rendimento

Pela Figura 4.4 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostraram independentes e a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, sem apresentar tendência.

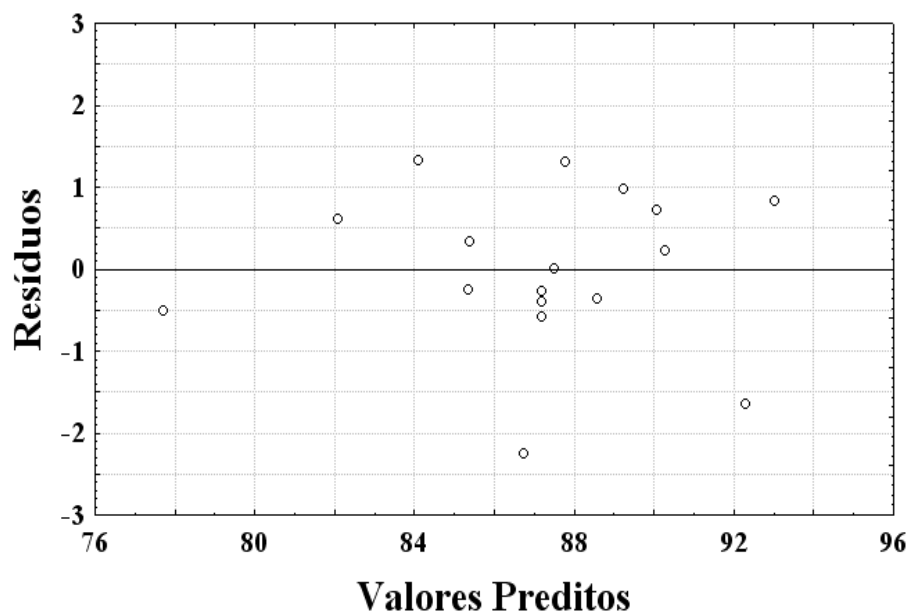


Figura 4.4 - Distribuição dos resíduos relativos ao rendimento

A Figura 4.5 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 (concentração de sacarose) e X_2 (concentração celular) para a resposta rendimento.

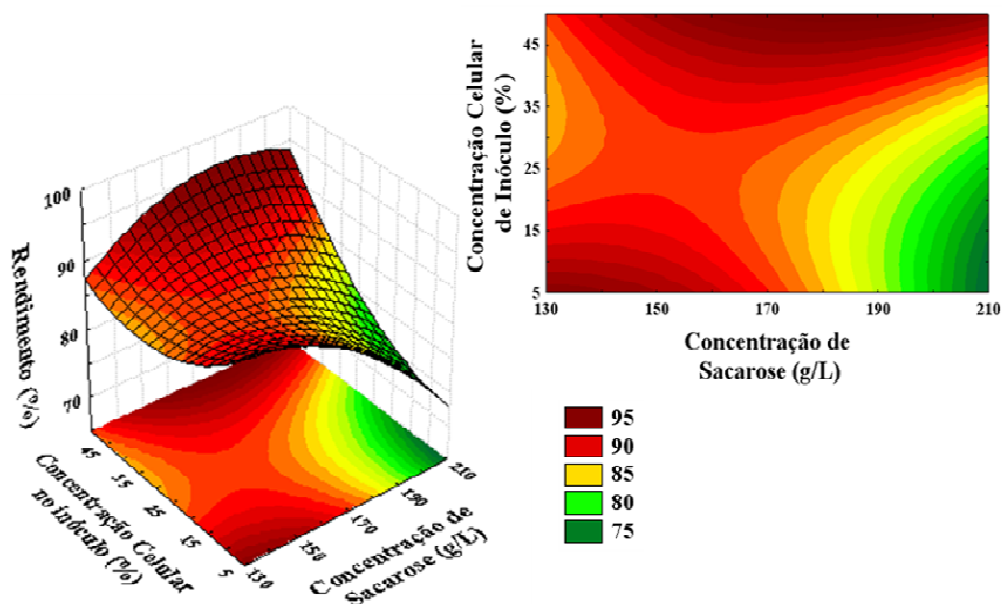


Figura 4.5 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração de sacarose e concentração celular no inóculo

Pela Figura 4.5 observa-se rendimentos maiores para concentração de sacarose variando de 150 – 190 g/L e concentração celular no inóculo maior que 35% (v/v). Vale ressaltar que o emprego de uma faixa maior de concentração de sacarose é viável para o processo, pelo fato de poder utilizar caldos mais concentrados na indústria alcooleira. A Figura 4.6 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 (concentração de sacarose) e X_3 (tempo de enchimento) para o rendimento. Nesta figura fica claro o aumento do rendimento com maior tempo de enchimento, isso é explicado pelo fato das células sofrerem inibição pela concentração elevada de substrato. A utilização de reatores operando em batelada alimentada é particularmente muito importante para os processos fermentativos, pois ameniza a inibição do crescimento dos micro-organismos e a repressão catabólica (SENGUPTA e MODAK, 2001; ASTOLFI et al., 2011).

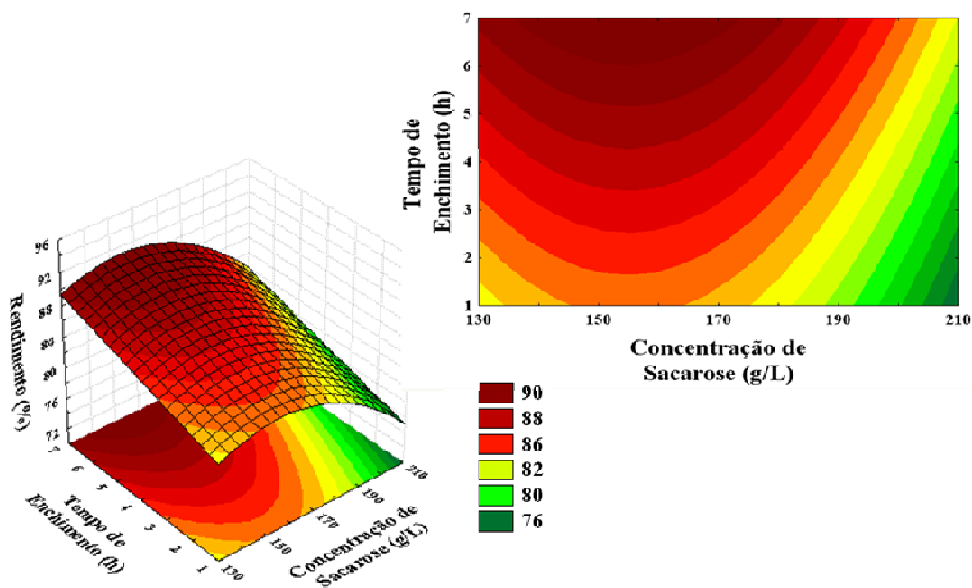


Figura 4.6 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração de sacarose e tempo de enchimento

Na Figura 4.6 observa-se que para obter rendimentos maiores que 90 %, o tempo de enchimento deve ficar em torno de 6 horas e concentração de sacarose de aproximadamente 160 g/L. Isto também é comprovado na Figura 4.7, na qual observa-se rendimentos maiores com tempo de enchimento maiores, podendo utilizar variadas concentrações celulares no inóculo.

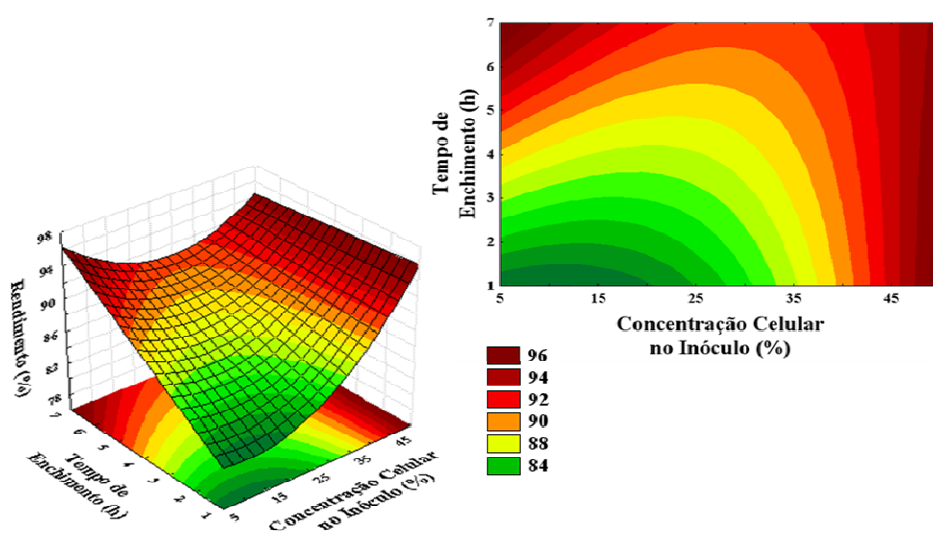


Figura 4.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função do tempo de enchimento e da concentração celular de inóculo

4.4.2 Análise dos resultados obtidos para a resposta produtividade em etanol das variáveis estudadas

Analizando estatisticamente o comportamento da resposta produtividade pela Tabela 4.3, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, conforme Tabela 4.6, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

Tabela 4.6 – Resultados da regressão múltipla para a resposta produtividade com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo Independente	6,123165	0,000000
X₁ (L)	0,013372	0,828928
X₁ (Q)	-0,245735	0,016713
X₂ (L)	0,848936	0,000002
X₂ (Q)	-0,823351	0,000016
X₃ (L)	-0,247022	0,004329
X₃ (Q)	-0,076424	0,363409
X₁X₂	0,411250	0,000725
X₁X₃	-0,053750	0,479523
X₂X₃	0,196250	0,029483
	R ² = 0,98	

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.3 completa com todos os parâmetros significativos e não significativos:

$$Y_{\text{Produtividade}} = 6,123165 + 0,013372X_1 - 0,245735X_1^2 + 0,848936X_2 - 0,823351X_2^2 - 0,247022X_3 - 0,076424X_3^2 + 0,411250X_1X_2 - 0,053750X_1X_3 + 0,196250X_2X_3 \quad (4.3)$$

As variáveis significativas do modelo para a resposta produtividade, mostradas na Tabela 4.6, foram: concentração de sacarose em seu termo quadrático X₁ (Q), concentração celular do inóculo em seu termo linear X₂ (L) e quadrático X₂ (Q), tempo

de enchimento do reator apenas em seu tempo linear X_3 (L) e as interações concentração de sacarose/concentração celular no inóculo (X_1X_2) e concentração celular no inóculo/tempo de enchimento (X_2X_3). Após a eliminação dos parâmetros não significativos, que foram X_1 (L), X_3 (Q) e a interação X_1X_3 , com $p > 0,05$, foram obtidos os seguintes parâmetros, conforme Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Resultados da regressão múltipla para a resposta produtividade, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo Independente	6,070771	0,000000
X_1 (Q)	-0,245735	0,007007
X_2 (L)	0,848936	0,000000
X_2 (Q)	-0,823399	0,000001
X_3 (L)	-0,247022	0,001178
X_1X_2	0,411250	0,000104
X_2X_3	0,196250	0,014578
	$R^2 = 0,98$	

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 4.4.

$$Y_{\text{Produtividade}} = 6,070771 - 0,245735X_1^2 + 0,848936X_2 - 0,823399X_2^2 - 0,247022X_3 + 0,411250X_1X_2 + 0,196250X_2X_3 \quad (4.4)$$

Pode-se notar pela Equação 4.4, que a variável isolada X_2 exerceu um maior efeito sobre a produtividade, sendo que maiores concentrações de células no inóculo aumentam a produtividade e também o rendimento, como na Equação 4.2. Por outro lado, a influência da variável X_3 , com sinal negativo, mostra que para um maior tempo de enchimento há uma diminuição na produtividade, porém a variável X_3 tem menor efeito que a variável X_2 . O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,98, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da produtividade, mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicados pela

equação empírica proposta. Na Figura 4.8 estão apresentados os valores preditos em função dos observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

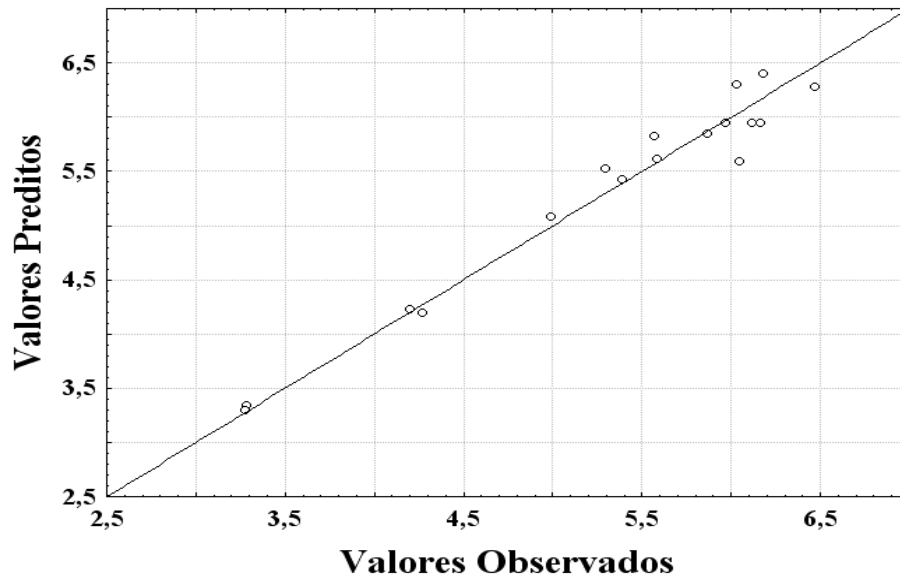


Figura 4.8 - Valores preditos em função dos observados em relação à produtividade

Pela Figura 4.9 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independentes e a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, sem apresentar tendência.

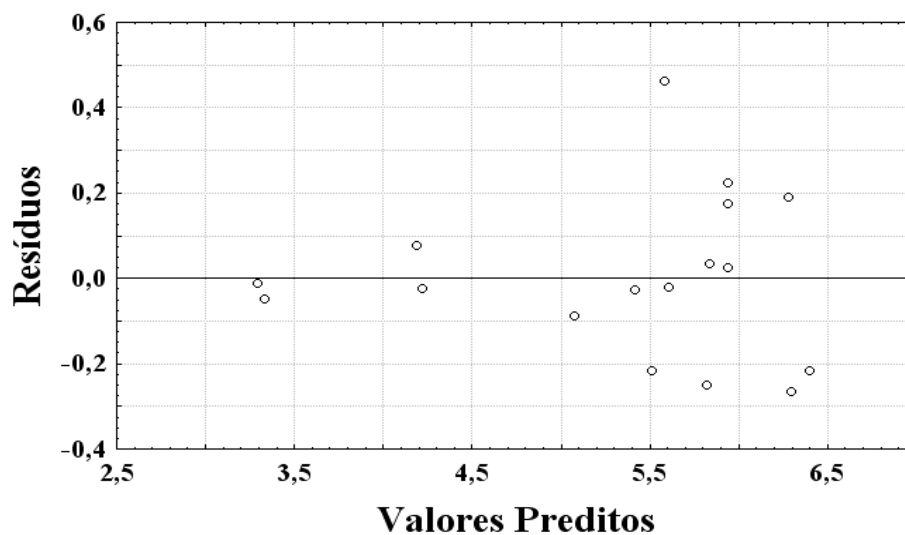


Figura 4.9 - Distribuição dos resíduos relativos à produtividade

Para a resposta produtividade em etanol houve uma variação de 3,28 g_{etanol}/L.h (Experimento 11) a 6,47 g_{etanol}/L.h (Experimento 13). A partir do modelo, foram construídas as superfícies de respostas e assim definido a região de trabalho de maior interesse para o processo. A Figura 4.10 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 (concentração de sacarose) e X_2 (concentração celular no inóculo) para a produtividade.

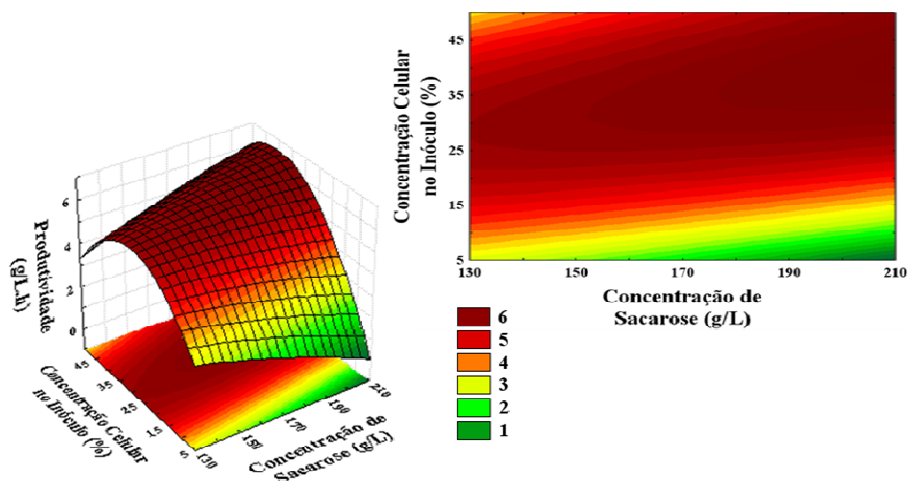


Figura 4.10 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração de sacarose e concentração celular no inóculo

Observando a Figura 4.10 nota-se produtividade maior, com maiores concentrações de células no inóculo, o qual fica claro a influência da variável X_2 . A Figura 4.11 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 (concentração de sacarose) e X_3 (tempo de enchimento) para a produtividade. Nesta figura percebe-se que um menor tempo de enchimento, melhora a produtividade. Esse comportamento já era esperado, pelo fato que quanto maior o tempo de enchimento, maior será o tempo para consumir o substrato que está sendo colocado no reator e menor será a produtividade.

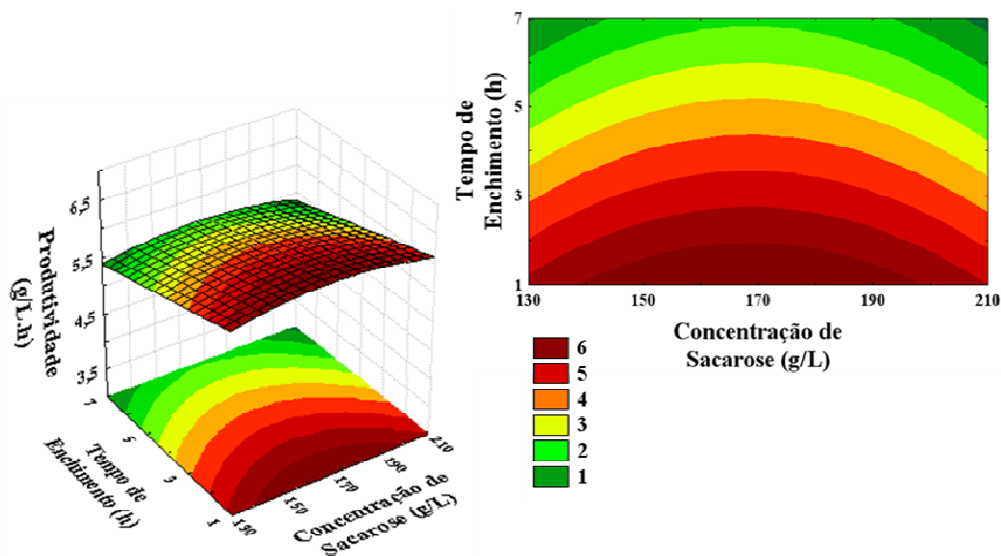


Figura 4.11 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração de sacarose e tempo de enchimento

Para maiores produtividades, pode-se notar pela Figura 4.12 que deve se utilizar concentração celular no inóculo de 30 a 40%.

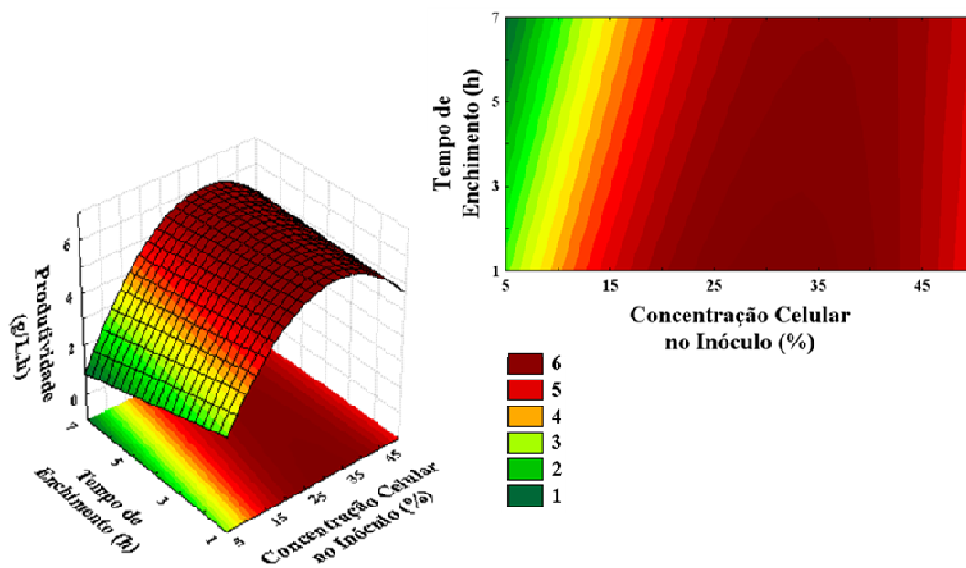


Figura 4.12 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função do tempo de enchimento e da concentração celular de inóculo

4.4.3 Análise dos resultados obtidos para a resposta sacarose residual das variáveis estudadas

Outra resposta analisada foi à sacarose residual, ou seja, a concentração de sacarose presente no meio após 10,5 h de fermentação. Ao contrário das respostas rendimento e produtividade, é de interesse que a sacarose residual seja minimizada. Quando há sobras de sacarose ao final da fermentação a indústria acaba tendo prejuízos, por não ter aproveitado este açúcar para transformá-lo em álcool e também por estar enviando o mesmo para o efluente do processo, podendo provocar problemas ambientais. Na Tabela 4.8, estão apresentados os coeficientes de regressão das variáveis e interações, incluindo os parâmetros significativos e não significativos para a resposta sacarose residual.

Tabela 4.8 – Resultados da regressão múltipla para a resposta sacarose residual com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo Independente	30,4037	0,000015
X₁ (L)	20,0051	0,000005
X₁ (Q)	2,6453	0,256220
X₂ (L)	-16,2191	0,000021
X₂ (Q)	20,1190	0,000032
X₃ (L)	8,8259	0,000966
X₃ (Q)	3,7048	0,126974
X₁X₂	-7,1775	0,008026
X₁X₃	2,0275	0,335068
X₂X₃	-6,5475	0,012376
R² = 0,98		

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.5 completa com todos os parâmetros significativos e não significativos:

$$Y_{S_{Residual}} = 30,4037 + 20,0051X_1 + 2,6453X_1^2 - 16,2191X_2 + 20,1190X_2^2 + 8,8259X_3 + 3,7048X_3^2 - 7,1775X_1X_2 + 2,0275X_1X_3 - 6,5475X_2X_3 \quad (4.5)$$

As variáveis significativas do modelo para a resposta sacarose residual, mostradas na Tabela 4.8, foram: concentração de sacarose em seu termo linear X_1 (L), concentração celular do inóculo em seu termo linear X_2 (L) e quadrático X_2 (Q), tempo de enchimento do reator apenas em seu termo linear X_3 (L) e as interações concentração de sacarose/concentração celular (X_1X_2) e concentração celular/tempo de enchimento (X_2X_3). Após a eliminação dos parâmetros não significativos, que foram X_1 (Q), X_3 (Q) e a interação X_1X_3 , com $p > 0,05$, foram obtidos os seguintes parâmetros, apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Resultados da regressão múltipla para a resposta sacarose residual, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo Independente	34,7571	0,000000
X_1 (L)	20,0051	0,000001
X_2 (L)	-16,2191	0,000005
X_2 (Q)	20,1230	0,000008
X_3 (L)	8,8259	0,000675
X_1X_2	-7,1775	0,008508
X_2X_3	-6,5475	0,013854
$R^2 = 0,97$		

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 4.6.

$$Y_{S_{Residual}} = 34,7571 + 20,0051X_1 - 16,2191X_2 + 20,1230X_2^2 + 8,8259X_3 - 7,1775X_1X_2 - 6,5475X_2X_3 \quad (4.6)$$

Observando a Equação 4.6, percebe-se que a variável isolada X_1 exerceu uma grande influência no aumento da resposta, mostrando que se deve utilizar menor

concentração de sacarose para minimizar o seu resíduo. A variável isolada X_2 mostra que a utilização de uma maior concentração celular exerce um efeito de diminuição da sacarose residual. O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,97, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção do açúcar residual, mostrando que 97% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta. Na Figura 4.13 estão apresentados os valores preditos em função dos observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

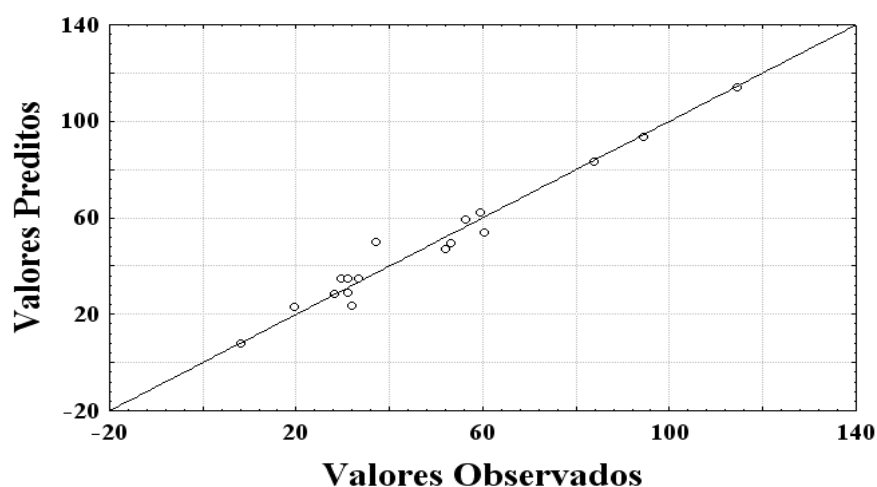


Figura 4.13 - Valores preditos em função dos observados em relação à sacarose residual

Pela Figura 4.14 pode-se observar que os erros de ajustamento se mostram independentes e a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, sem apresentar tendência.

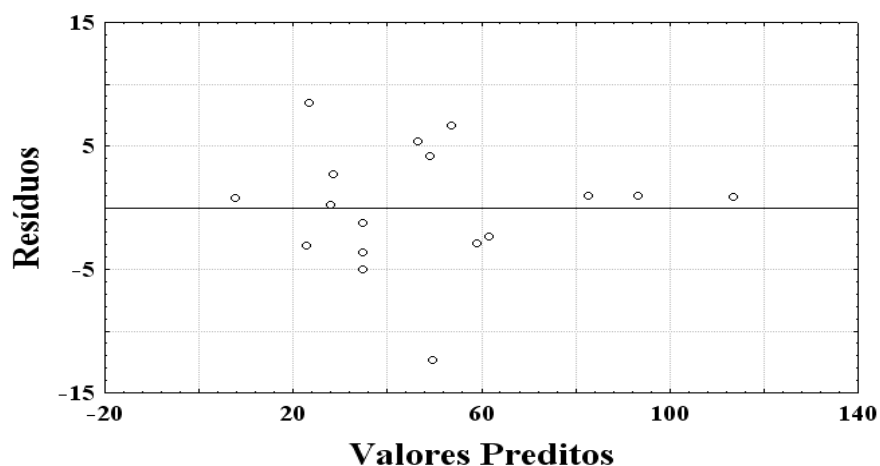


Figura 4.14 - Distribuição dos resíduos relativos à sacarose residual

O açúcar residual variou de 8,39 g/L (Experimento 9) a 114,48 g/L (Experimento 6). A partir do modelo, foram construídas as superfícies de respostas e assim definido a região de menor açúcar residual ao final do processo. A Figura 4.15 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 (concentração de sacarose) e X_2 (concentração celular no inóculo) para a sacarose residual. Nota-se que a resposta sacarose residual é menor para concentrações celular no inóculo entre 20 a 40% (v/v) e concentrações de sacarose tendendo para o mínimo.

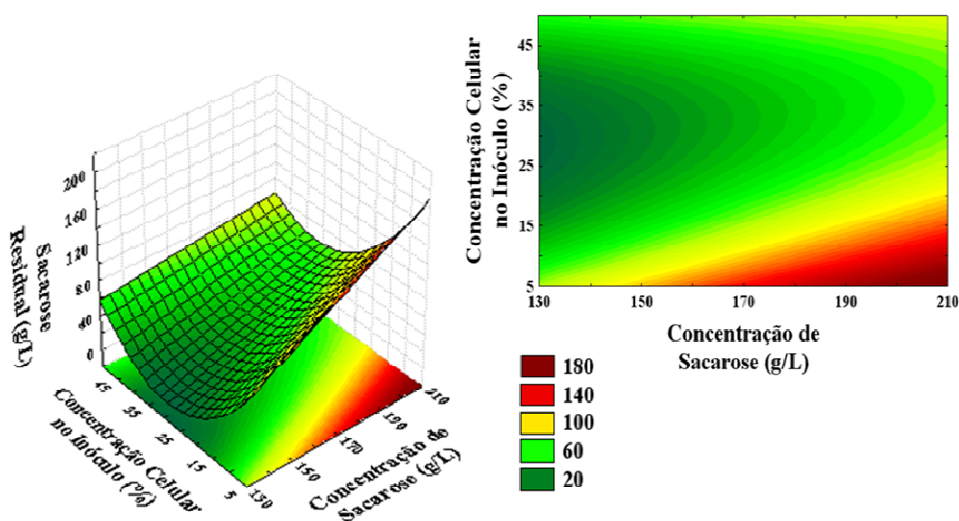


Figura 4.15 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de sacarose e concentração celular no inóculo

A Figura 4.16 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_1 (concentração de sacarose) e X_3 (tempo de enchimento) para a sacarose residual. Pode-se perceber que um menor tempo de enchimento resulta em uma pequena diminuição na sacarose residual.

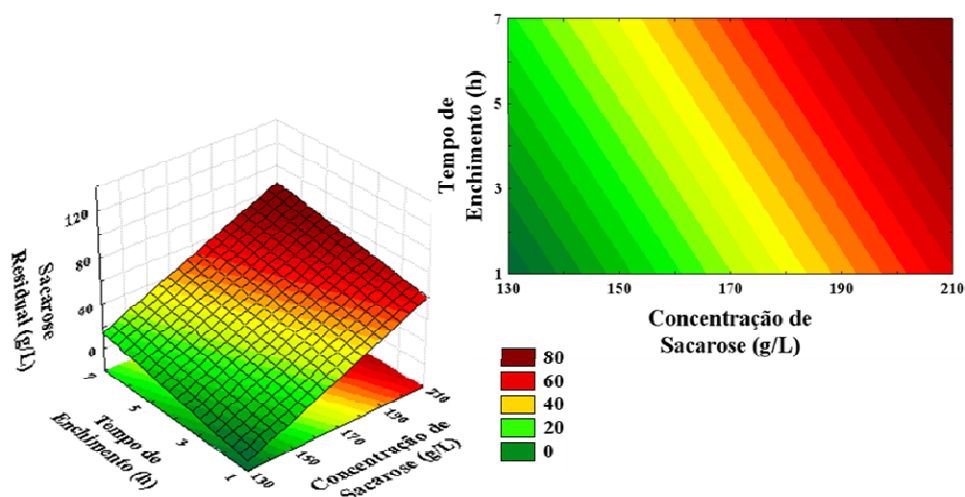


Figura 4.16 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função da concentração de sacarose e tempo de enchimento

A Figura 4.17 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno em função de X_2 (concentração celular no inóculo) e X_3 (tempo de enchimento) para a sacarose residual. Nota-se que para se obter uma menor concentração de sacarose residual é melhor que se utilize um menor tempo de enchimento.

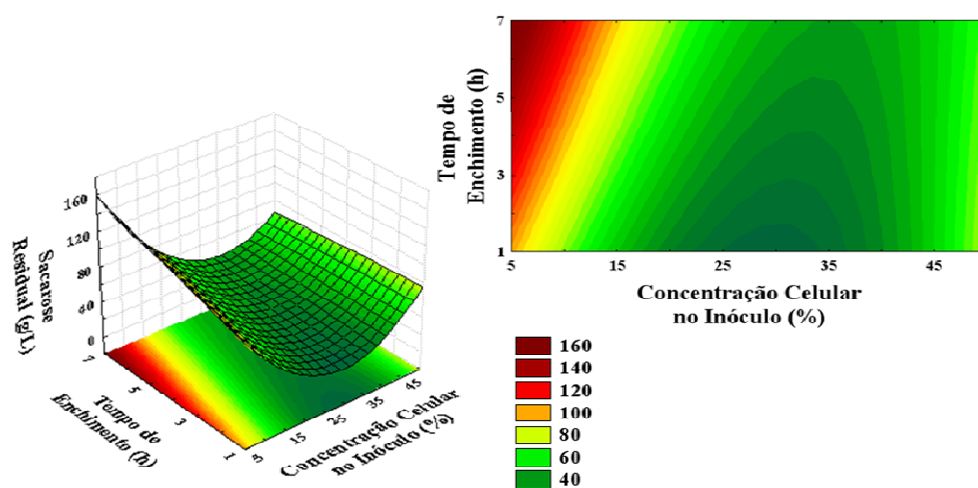


Figura 4.17 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta sacarose residual em função do tempo de enchimento e da concentração celular de inóculo

Analisando as Figuras (4.5, 4.6, 4.7, 4.10, 4.11 e 4.12) de rendimento e produtividade, constata-se que rendimentos em torno de 90% e produtividade em torno de 6 g/L.h foram obtidos para tempos de enchimento maiores que 6 horas e concentração celular no inóculo maior que 30%. Os resultados da Tabela 4.3 mostram que para a condição de tempo de enchimento de 6 horas e concentração celular no inóculo de 40% (experimentos 4 e 8) obteve-se as respostas mencionadas anteriormente, porém o experimento 8, o qual utilizou uma concentração de sacarose maior (190 g/L) resultou em uma concentração maior de sacarose residual. Para as respostas produtividade e sacarose residual essa contribuição foi relativamente menor, sendo que maiores tempos de enchimento proporcionaram redução na produtividade e aumento na sacarose residual. Nota-se, também, pelas figuras acima citadas, que rendimento e produtividade superiores a 90% e 6 g/L.h, respectivamente, a concentração de açúcar deve ser maior que 160 g/L e a concentração celular no inóculo próxima de 40% (v/v). Após a análise das variáveis das Equações 4.2, 4.4 e 4.6 para as respostas, rendimento em etanol, produtividade e sacarose residual, respectivamente e observação das curvas de contorno das Figuras (4.5, 4.6, 4.7, 4.10, 4.11, 4.12, 4.15, 4.16 e 4.17), foi possível estabelecer as faixas as quais se obteve melhores rendimentos e produtividades e valores de sacarose residual que não foram os maiores obtidos no PCC. A concentração de sacarose estabelecida foi em 170 g/L, tempo de enchimento de 6 horas e concentração celular no inóculo de 40% (v/v). A partir da definição destas variáveis foi realizada a validação das equações dos modelos (4.2, 4.4 e 4.6) por meio de um experimento em triplicata até que a produção de etanol se estabilizasse. Estes experimentos foram realizados com a pré-fermentação, conforme item 3.2.1.6, e iniciou com uma concentração inicial de etanol no inóculo de 65,94 g/L (considerando uma batelada de 5 L a concentração de etanol inicial foi aproximadamente 19,78 g/L). O modelo previu um rendimento de 91,22%, produtividade de 6,12 g/L.h e sacarose residual de 44,33 g/L. Pelo experimento obteve-se um rendimento de $92,20 \pm 0,55\%$, produtividade em $6,01 \pm 0,12$ g/L.h e sacarose residual em $42,84 \pm 2,21$ g/L. O etanol produzido neste experimento foi de aproximadamente $63,07 \pm 3,83$ g/L (com o desconto da concentração inicial de etanol no inoculo) em 10,5 horas de fermentação. A sacarose foi completamente consumida até 21,5 horas de fermentação alcoólica. Os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o experimento de validação da condição otimizada por meio do PCC estão apresentados na Figura 4.18.

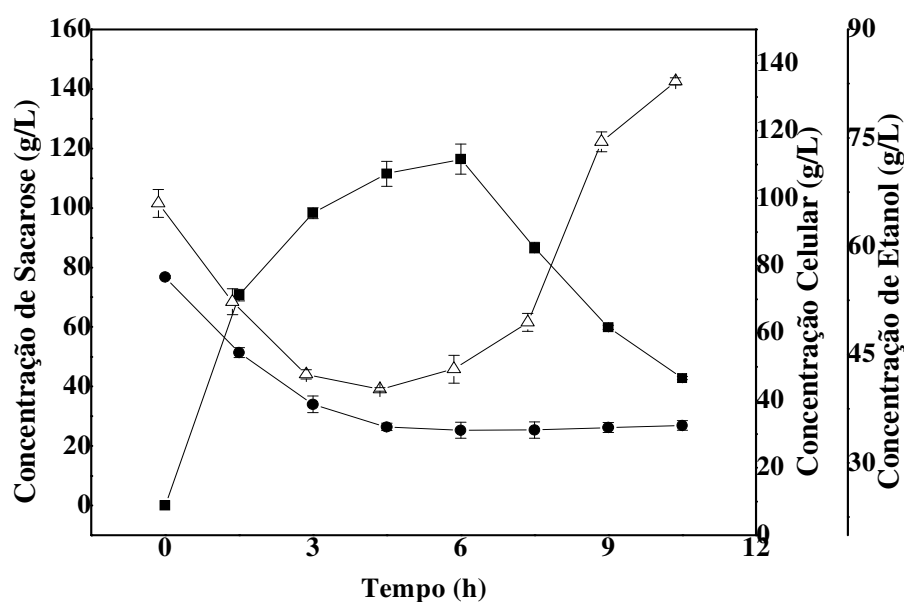


Figura 4.18 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o experimento de validação das condições de otimização obtido pela superfície de resposta e curvas de contorno

Com a análise completa dos resultados e do ponto ótimo escolhido, pode-se perceber que o processo apresentou bom rendimento (92,20%) e produtividade (6,01). Por outro lado, a sacarose residual (42,84 g/L) ao final do processo foi alta. Quando se reduz o açúcar residual ao final do processo tem como uma das consequências a melhoria da produtividade.

Algumas pesquisas foram realizadas utilizando levedura floculante no processo fermentativo em reator operado em batelada, e observaram-se concentrações elevadas de açúcar residual e tempos longos de fermentação para o consumo total desses açúcares. Por outro lado os dados obtidos na literatura para reatores contínuos mostram maiores produtividades quando comparado a reatores em batelada. Viegas, Andrietta e Andrietta (2002) trabalharam com dois reatores tipo torre, ligados em série, utilizando leveduras floculantes e obtiveram produtividade máxima em etanol de 15,40 g/L.h e rendimento em torno de 93%. Viegas (2003) estudou o desempenho de leveduras com características floculantes em um sistema de três reatores em série, obtendo elevada produtividade, 27,5 g/L.h, e rendimento em torno de 90%. Xu, Zhao e Bai (2005) estudaram a fermentação alcoólica contínua em quatro estágios (tanques em série) usando levedura floculante SPSC01 e obtiveram produtividade de 3,44 g/L.h e

rendimento teórico de 91,1 %, com tempo de fermentação de 25 a 35 horas e glicose residual de 2 a 3 g/L. Reddy e Reddy (2006) utilizaram uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* CFTRI 101 em reator em batelada e obtiveram 1,84 a 2 g/L.h e 20 a 75 g/L de produtividade em etanol e glicose residual, respectivamente. Wang et al. (2006) utilizaram um sistema de fermentação alcoólica contínuo composto de três estágios, tanques em série, juntamente com dois tanques de sedimentação. Uma estirpe de levedura floculante desenvolvido por uma fusão a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe* Schizo foi aplicado ao processo. A produtividade de etanol obtida foi de 5,77 g/L.h. Andrietta, Steckelberg e Andrietta (2008) propuseram um estudo para avaliar a retenção de 12 diferentes cepas de leveduras de *Saccharomyces sp.*, com características floculantes. Estas leveduras foram inoculadas em um processo com reatores contínuos. O sistema foi composto por dois reatores ligados em série, sem reciclo de células. O sistema atingiu níveis de rendimento de 83,53% em relação ao rendimento teórico, com uma conversão de açúcares redutores totais de 92,68%. Ma et al. (2009) estudaram uma levedura floculante de *Saccharomyces cerevisiae* KRM-1. Neste estudo foram realizadas 10 bateladas com reciclo de células, e obtiveram uma produtividade de 8,25 g/L.h e ao final da última batelada obteve-se uma produtividade de 10,08 g/L.h. O reciclo de células floculantes foi rápido e conveniente, e portanto, pode ser aplicado em escala industrial para a produção de etanol. Li, Lin e Tran (2009) utilizaram uma levedura floculante de *Saccharomyces cerevisiae* em reator em batelada, com consecutivas bateladas, e obtiveram rendimento de 90,8% e produtividade de 8,2 g/L.h. O tempo de fermentação variou de 8 horas para 14 horas. Choi et al. (2010) estudaram uma levedura de fusão híbrida, CHFY0321. Esta fusão foi obtida por meio de uma levedura não floculante de *Saccharomyces cerevisiae* (CHY1011), com alta capacidade de produção de etanol e com uma levedura floculante *Saccharomyces bayanus* (KCCM12633), com baixa capacidade de produção de etanol. O reator utilizado foi operado em batelada, obtendo um rendimento teórico de 94,2% e produtividade de 1,38 g/L.h. Tang et al. (2010) estudaram o processo de fermentação alcoólica em reator contínuo, utilizando uma estirpe de levedura floculante KF-7. Estes pesquisadores encontraram uma produtividade de 6,6 g/L.h operado com sucesso durante mais de um mês. Pacheco (2010) estudou o processo de produção de etanol utilizando um reator tubular de escoamento ascendente com recirculação externa, com uma cepa de levedura com características floculantes. O rendimento obtido nesse estudo foi de 98%, produtividade de 13,4 g/L.h e concentração residual de sacarose de 3,1 g/L.

Zhao et al. (2012) realizaram testes com leveduras flocculantes em bateladas repetidas. A levedura BHL01 de *Saccharomyces cerevisiae* atingiu de 8,30 g/L.h, concentração final de etanol de 121,6 g/L e o coeficiente de rendimento de 0,468 g/g. Em outro estudo foi utilizado uma levedura flocculante SPSC01 e a produtividade encontrada foi em torno de 7,63 g/L.h, concentração final de etanol de 120,4 g/L e coeficiente de rendimento de 0,462 g/g. Gomes et al. (2012) estudaram uma estirpe flocculante recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*. O gene FLO 1 foi transferido para a levedura industrial PE-2. Em 10 bateladas repetidas e reciclo de células, atingiu uma produtividade média de 2,86 g /L.h e concentração de glicose residual média de 28,4 g/L. Devido à estirpe ser flocculante, é possível reduzir o custo de produção de etanol pelo fato de não utilizar centrifugas na separação. Observando os resultados dos artigos pesquisados e relacionando ao trabalho em questão, constata-se que estes pesquisadores citados também obtiveram alta concentração de açúcar residual e longo tempo de fermentação.

Os resultados apresentados no presente estudo empregando reator batelada alimentada quando comparado com os obtidos na literatura mostram valores promissores, sendo superior aos obtidos em vários trabalhos citados anteriormente.

4.5 Influência do recirculação de células e concentração de etanol e sacarose no inóculo na fermentação alcoólica

Com o objetivo de reduzir o açúcar residual, melhorar a produtividade e aumentar a concentração de etanol formado são apresentados alguns experimentos realizados com pequenas modificações de processo. Os experimentos A e B, conforme item 3.2.2.5, foram realizados com as mesmas condições do ponto ótimo escolhido no PCC, porém o Experimento A utilizou a recirculação de células após o tempo de enchimento enquanto o Experimento B utilizou a recirculação durante toda a fermentação incluindo o tempo de enchimento. Na Figura 4.19 são apresentados os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento A, com recirculação após as 6 horas de enchimento do reator.

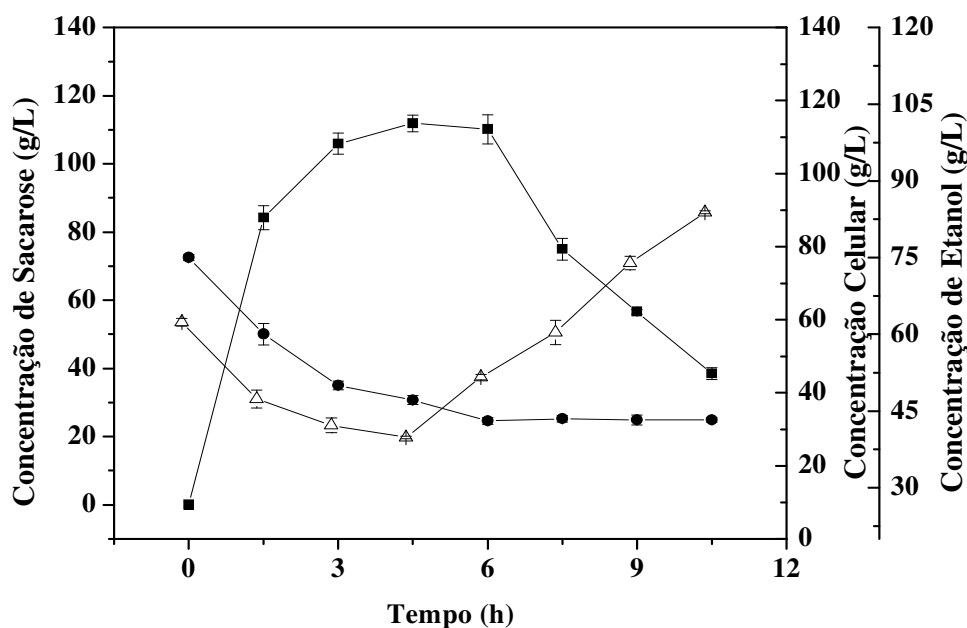


Figura 4.19 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ), concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento A, realizado nas condições ótimas do PCC e com recirculação do meio fermentativo, após as 6 horas de enchimento do reator

Na Figura 4.20 estão apresentados os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento B, com recirculação durante toda a fermentação. Analisando os resultados do Experimento A, pela Figura 4.19, nota-se que em 10,5 horas de fermentação obteve-se rendimento de 92,5%, produtividade de 6,20 g/L.h e sacarose residual de 38,46 g/L. Para o Experimento B, conforme resultados mostrados na Figura 4.20, observa-se um rendimento de 92,29%, produtividade de 6,24 g/L.h e sacarose residual de 37,94 g/L. O etanol produzido ao final da fermentação foi de 65,12 g/L e 65,56 g/L para o Experimento A e B, respectivamente. Pode-se notar, tanto para o Experimento A quanto para o Experimento B a obtenção de resultados semelhantes. Por outro lado quando é feita a comparação ao Experimento do ponto ótimo do PCC, pode-se notar que houve um pequeno acréscimo na produtividade e na concentração de etanol produzido e uma diminuição na sacarose residual, mantendo o mesmo rendimento em torno de 92%. Com estes resultados pode-se avaliar que a recirculação de células melhora o desempenho da fermentação, pois o movimento que a

mesma proporciona faz com que haja maior contato do meio com o micro-organismo e a dispersão de moléculas no caldo.

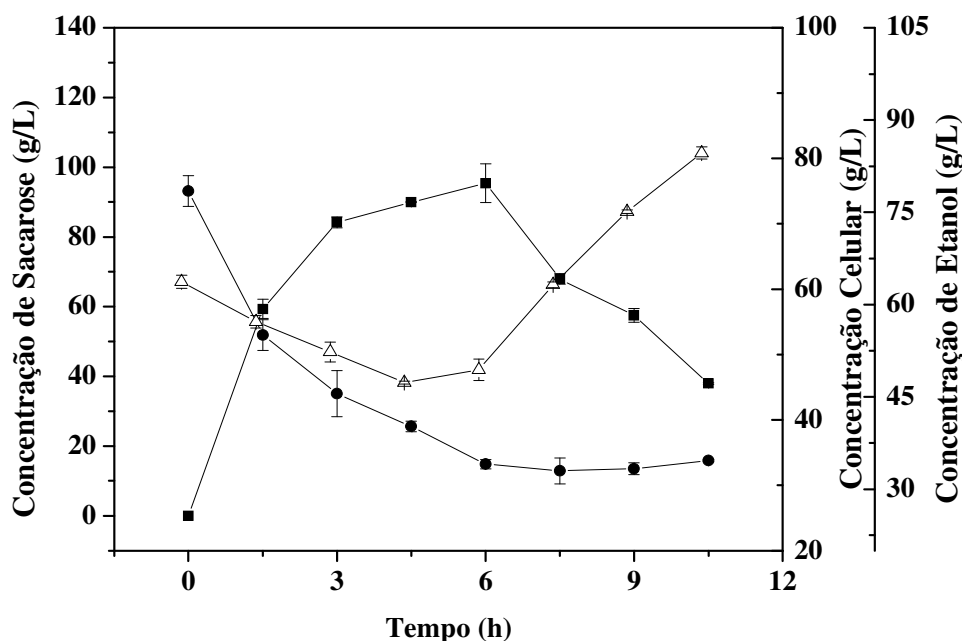


Figura 4.20 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento B, realizado nas condições ótimas do PCC e com recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica

A partir deste estudo realizou-se alguns experimentos, sem etanol inicial, para observar qual a influência nas respostas (rendimento, produtividade e sacarose residual) a concentração de etanol no inóculo pode representar na fermentação. O Experimento C foi realizado nas mesmas condições do ponto ótimo do PCC, porém sem etanol inicial e com substrato no inóculo. Pelo fato do inóculo conter substrato inicial utilizou-se a recirculação durante toda a fermentação para que o meio fermentativo ficasse com boa mistura. Na Figura 4.21 estão apresentados os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento C, com recirculação durante toda a fermentação, sem etanol inicial e com substrato no inóculo.

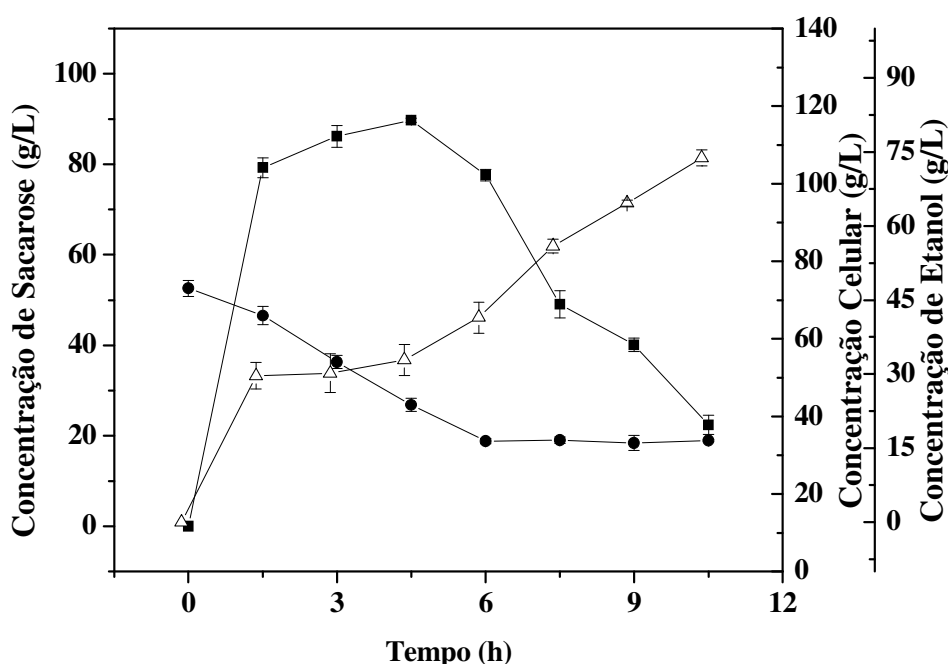


Figura 4.21 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento C realizado nas condições ótimas do PCC. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizado a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica

No Experimento C obteve-se um rendimento de 92,97%, produtividade de 7,03 g/L.h e sacarose residual de 22,39 g/L em 10,5 horas de fermentação. O etanol produzido foi de 73,82 g/L. Quando comparados estes resultados com os resultados do Experimento do ponto ótimo do PCC, pode-se notar maior rendimento e produtividade, menor concentração de sacarose residual ao final de 10,5 horas de fermentação e um aumento na produção de etanol. No Experimento C percebeu-se uma melhoria significativa no processo. A partir desse resultado foi realizado mais dois Experimentos (D e E), para observar alguma mudança no processo. O Experimento D foi realizado nas mesmas condições do Experimento C, porém não foi adicionado meio com substrato no inóculo. Iniciou-se esse processo apenas com a levedura decantada no fundo do reator e o meio fermentativo foi adicionado durante as 6 horas de enchimento. A recirculação iniciou-se quando o reator atingiu 1,5 L de seu volume. Na Figura 4.22 estão apresentados os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o

Experimento D, com recirculação durante toda a fermentação, sem etanol inicial e sem substrato no inóculo.

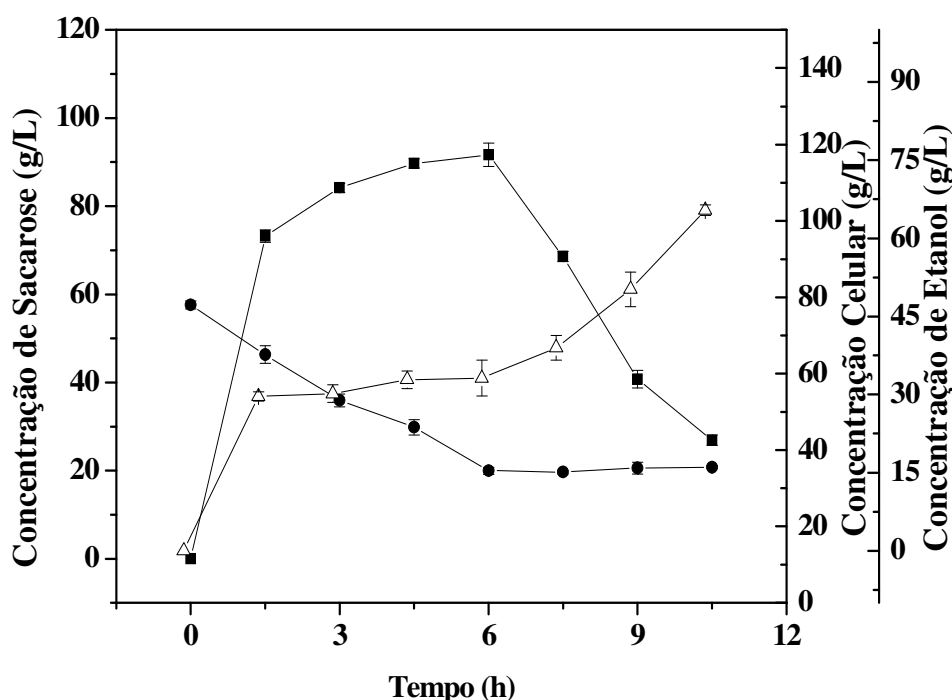


Figura 4.22 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento D realizado nas condições ótimas do PCC. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e iniciado o tempo de enchimento apenas com a levedura decantada no fundo do reator e realizado a recirculação do meio fermentativo após o enchimento de 1,5 L do reator

Analisando os resultados do Experimento D verificou-se um rendimento de 84,99%, produtividade de 6,23 g/L.h e sacarose residual de 26,95 g/L em 10,5 horas de fermentação. O etanol produzido foi de 65,40 g/L. Quando comparados estes resultados com os resultados do Experimento C, observa-se uma diminuição no rendimento, na produtividade e no etanol produzido, com sacarose residual próxima para ambos experimentos. Uma das hipóteses para explicar os menores resultados obtidos foi o fato da fermentação iniciar sem uma mistura do meio com o micro-organismo. O experimento E foi realizado com as mesmas condições do Experimento C, porém o inóculo iniciou-se sem etanol inicial e sem substrato. A levedura decantada no fundo reator foi completada com água destilada para formar o inóculo e assim começar o enchimento do reator com o meio. Na Figura 4.23 estão apresentados os perfis de

concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento E, com recirculação durante toda a fermentação, sem etanol inicial e sem substrato no inóculo, apenas com água destilada.

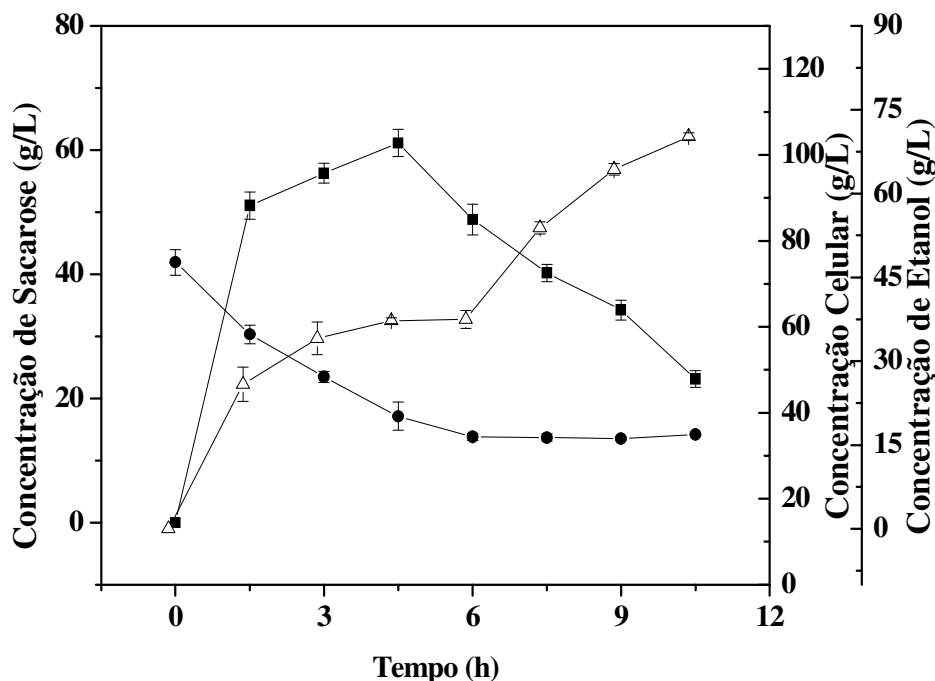


Figura 4.23 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento E realizado nas condições ótimas do PCC. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com água destilada até completar 1,5 L de inóculo e realizado a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica

Observando a Figura 4.23 e analisando os resultados obtidos, sendo rendimento de 88,91%, produtividade de 6,69 g/L.h, sacarose residual de 23,13 g/L e etanol produzido de 70,24 g/L em 10,5 horas de fermentação, pode-se notar que estas respostas ainda ficaram abaixo das respostas obtidas no Experimento C.

Visando o melhoramento da produtividade e diminuição da sacarose residual do Experimento C, foi realizado o Experimento F. Este experimento foi conduzido nas mesmas condições do Experimento C, porém a concentração celular foi maior, passando de 40 para 50 % (v/v) do inóculo. Pelas superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta produtividade do PCC, pode-se avaliar que maior concentração de célula no inóculo proporciona maiores produtividades. Na Figura 4.24 estão apresentados os

perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento F, com recirculação durante toda a fermentação, sem etanol e com substrato no inóculo e concentração celular no inóculo de 50% (v/v).

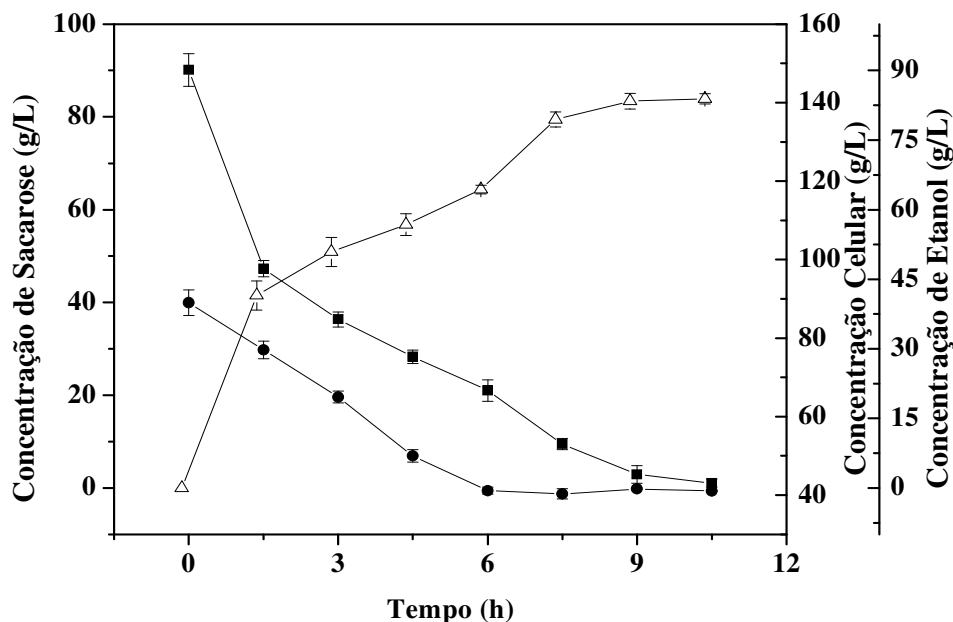


Figura 4.24 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento F realizado nas condições ótimas do PCC, porém a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v). Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizado a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica

Analisando a Figura 4.24, nota-se que a sacarose praticamente acabou em 9 horas de fermentação. Neste ponto o rendimento foi de 92,75%, produtividade de 9,26 g/L.h, concentração de sacarose residual de 2,9 g/L e concentração de etanol produzido ao final da fermentação de 83,37 g/L. Em 10,5 horas de fermentação a sacarose foi praticamente consumida. Este resultado confirma a orientação do PCC no sentido de que o aumento na concentração do inóculo proporciona aumento na produtividade e no rendimento e redução na concentração de sacarose residual. A partir deste experimento, realizou-se o Experimento G, com o intuito de melhorar ainda mais a produtividade. Este experimento foi realizado com as mesmas condições do Experimento F, porém o tempo de enchimento passou de 6 para 4 horas. Na Figura 4.25 estão apresentados os

perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento G, com recirculação durante toda a fermentação, sem etanol inicial e com substrato no inóculo e tempo de enchimento de 4 horas.

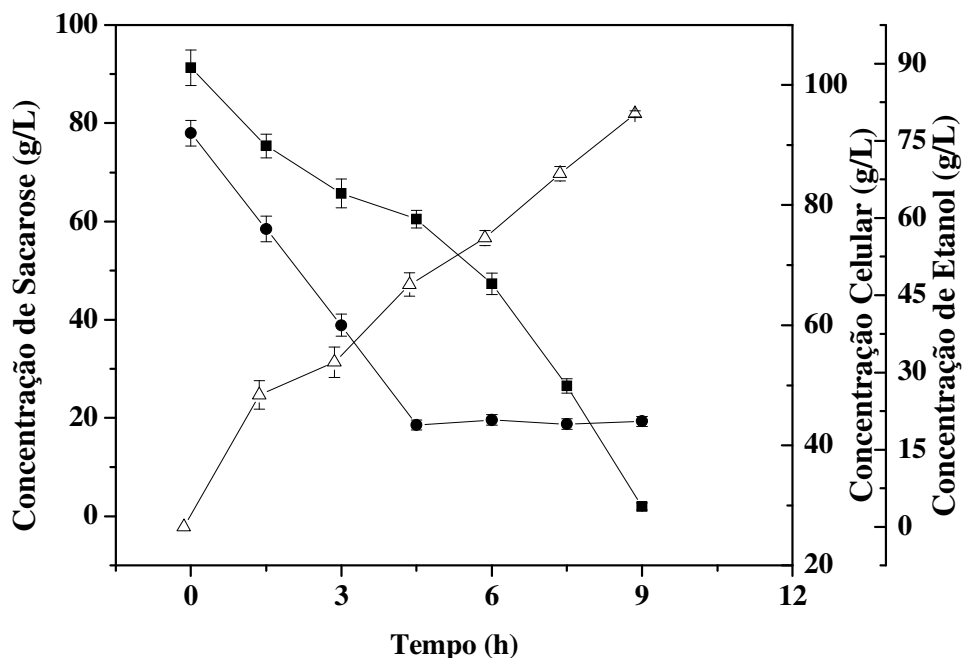


Figura 4.25 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento G realizado nas condições ótimas do PCC, porém a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v) e o tempo de enchimento de 4 horas. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizado a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica

Na análise dos resultados do Experimento G, pode-se notar que a sacarose praticamente terminou em 9 horas de fermentação, com concentração final de 1,98 g/L. O rendimento obtido foi de 87,26%, produtividade de 8,76 g/L.h e etanol produzido ao final de 9 horas de fermentação de 78,86 g/L. Este experimento mostrou uma diminuição de rendimento, produtividade e produção de etanol em relação ao Experimento F. Este fato também é explicado pelas superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento, pois quando se utiliza concentração celular alta o tempo de enchimento deve ficar em torno de 6 horas.

Alguns requisitos são importantes para a escolha de uma levedura para o processo fermentativo, como: alto rendimento em etanol, alta produtividade, boa

resistência bacteriana e boa adaptação com concentrações mais elevadas de substrato. Com isso, foi realizado o Experimento H, nas mesmas condições do Experimento G, porém a concentração de sacarose do meio fermentativo passou de 170 g/L para 220 g/L. Na Figura 4.26 estão apresentados os perfis de concentração celular, de sacarose e etanol obtidos para o Experimento H, com recirculação durante toda a fermentação, sem etanol inicial, com substrato no inóculo e meio com concentração de sacarose de 220 g/L.

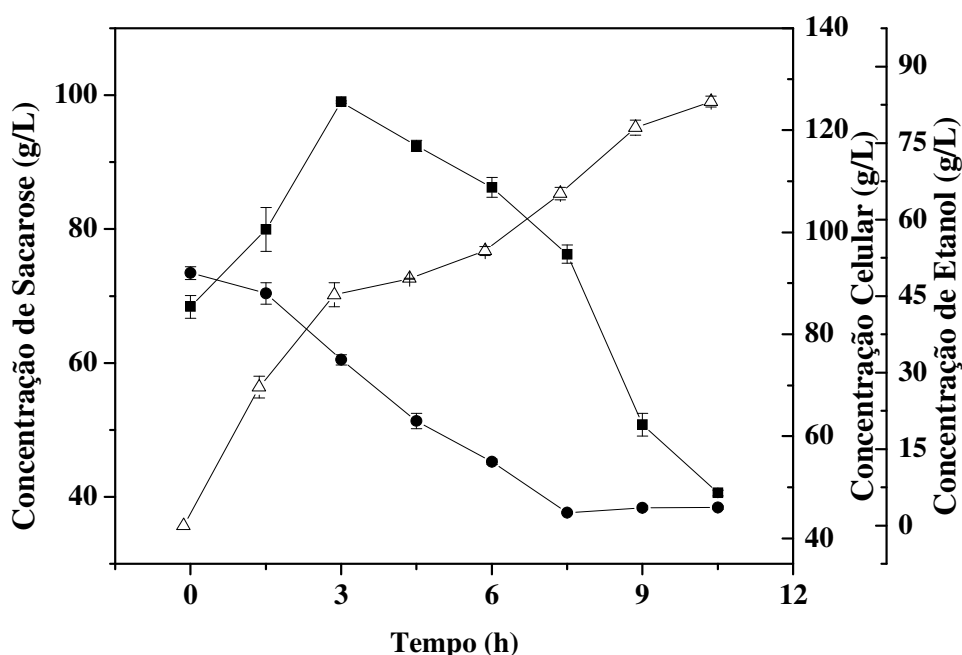


Figura 4.26 – Perfis de concentração de sacarose (■), Concentração de etanol (Δ) e concentração celular (●) em função do tempo para o Experimento H realizado nas condições ótimas do PCC, porém a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v) e a concentração de sacarose foi de 220 g/L. Foi retirado o sobrenadante contendo etanol e preenchido com meio até completar 1,5 L de inóculo e realizado a recirculação do meio fermentativo durante toda a fermentação alcoólica

A partir dos resultados obtidos pelo Experimento H, obteve-se um rendimento de 86,11%, produtividade de 7,91 g/L.h, sacarose residual de 40,58 g/L e etanol produzido ao final de 10,5 horas de fermentação de 83,10 g/L. Comparando este experimento com o Experimento F, pode-se observar uma diminuição no rendimento e produtividade. Porém o experimento se mostrou positivo quando comparado a dados da literatura. Observando os dados da literatura, pode-se perceber que a maioria dos

estudos que envolvem leveduras flocculantes com reator batelada, o processo necessitou de tempos longos de fermentação. He, Zhao e Bai (2012) estudaram uma cepa *Saccharomyces cerevisiae* com o gene FLO1 isolado da levedura flocculante SPSC0 e realizaram testes em frascos Erlenmeyer, com a concentração inicial de glicose de 250 g/L. Quase toda a glicose foi consumida no prazo de 48 horas, cerca de 110 g de etanol/L foi produzido.

O presente trabalho apresentou como principal contribuição para o processo de fermentação alcoólica com levedura flocculante o emprego da recirculação de células. Isso contribuiu sensivelmente para uma melhor homogeneização do meio, com diminuição das resistências à transferência de massa, com conseqüente aumento de rendimento e produtividade em relação ao mesmo processo sem recirculação. A decantação de células de levedura contribui para a diminuição do teor de álcool no fermento reciclado e esse fato contribui para a diminuição da inibição pelo produto durante a fermentação.

Os micro-organismos podem ser inibidos pelo próprio substrato utilizado ou produtos formados. Por exemplo, os produtos tais como o etanol, butanol, acetona, ácido acético têm um forte impacto sobre o crescimento de células devido à sua elevada toxicidade. Quando se utiliza a levedura *S. cerevisiae* para produzir etanol, pode-se notar ao longo do processo a morte celular pela toxidade do produto. Em conclusão, quando o produto é altamente tóxico não se pode esperar um aumento significativo na concentração do produto final (DOMBEK e INGRAM, 1988; SRIYUDTHSAK e SHIRAISHI, 2010).

Pelos experimentos realizados, nota-se que o etanol pode influenciar fortemente na fermentação alcoólica. Comparando o Experimento B com o Experimento C essa influência fica clara, pois a produção de etanol aumentou ao final de 10,5 horas, pelo fato da fermentação não iniciar com etanol no inóculo. O experimento no qual se obteve os melhores resultados no processo fermentativo em batelada alimentada neste trabalho, utilizando a levedura C2/00, foi o Experimento F. Os resultados obtidos foram: 92,75% de rendimento, 9,26 g/L.h de produtividade, 2,9 g/L de concentração de sacarose residual e concentração de etanol produzido de 83,37 g/L em 9 horas de processo fermentativo. Este resultado mostra que a utilização de leveduras flocculantes em processo batelada alimentada apresenta resultados satisfatórios quando comparado aos da literatura apresentado anteriormente (XU, ZHAO e BAI, 2005; REDDY e REDDY, 2006; WANG et al., 2006; CHOI et al., 2010; TANG et al.,

2010; ZHAO et al., 2012; GOMES et al., 2012). A análise conjunta das variáveis estudadas, empregando o Planejamento Composto Central, foi importante para orientar a realização de uma sequência de experimentos. Com isso possibilitou determinar condições que melhorasse o desempenho do processo batelada alimentada com levedura floculante. Além disso, os resultados alcançados neste estudo são iguais ou superiores aos obtidos nas usinas brasileiras, que utilizam leveduras não floculantes.

4.6 Estimativa dos parâmetros do modelo para a fermentação em batelada

A partir dos resultados experimentais da fermentação em batelada foi realizada a estimativa dos parâmetros do modelo de Tosetto e Andrietta (2002), conforme Equação 4.7. Os parâmetros calculados e os obtidos pelo ajuste do modelo aos resultados experimentais estão apresentados na Tabela 4.10.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad (4.7)$$

Tabela 4.10 – Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo em batelada

Parâmetros	Dimensionais
μ_m [h ⁻¹]	0,103 ± 0,260x10 ⁻¹
1/Y _{x/S} [gS/(gX)]	16,2 ± 3,70
1/Y _{x/P} [gP/(gX)]	4,69 ± 4,90x10 ⁻²
P _{máx} [g/L]	114,3 ± 83,00x10 ⁻¹
n	0,63 ± 0,24
Ms[gS/(gX.h)]	0
b[gP/(gX.h)]	0,09 ± 0,18 x 10 ⁻¹
K _S [gS/L]	30,24 ± 0,11 x 10 ⁺¹
K _I [gS/L]	109,86 ± 0,22 x 10 ⁺²

Pacheco (2010) utilizou a levedura floculante de *Saccharomyces cerevisiae* em reator tubular, tipo torre, operando em batelada, sem agitação e encontrou valores para K_S e K_I igual a 34,2 e 181,6 g/L. Avaliando os valores encontrados por Pacheco (2010),

pode-se notar que a inibição pelo substrato foi menor que a encontrada neste trabalho, uma vez que o valor K_I (109,86 g/L) foi inferior ao encontrado pelo outro autor (181,6 g/L). A Figura 4.27 apresenta os resultados simulados pelo modelo e os experimentais. Pode-se notar que o modelo proposto, representou de forma satisfatória os resultados experimentais. Outro indicativo positivo do bom ajuste foi o desvio padrão obtido para cada parâmetro calculado.

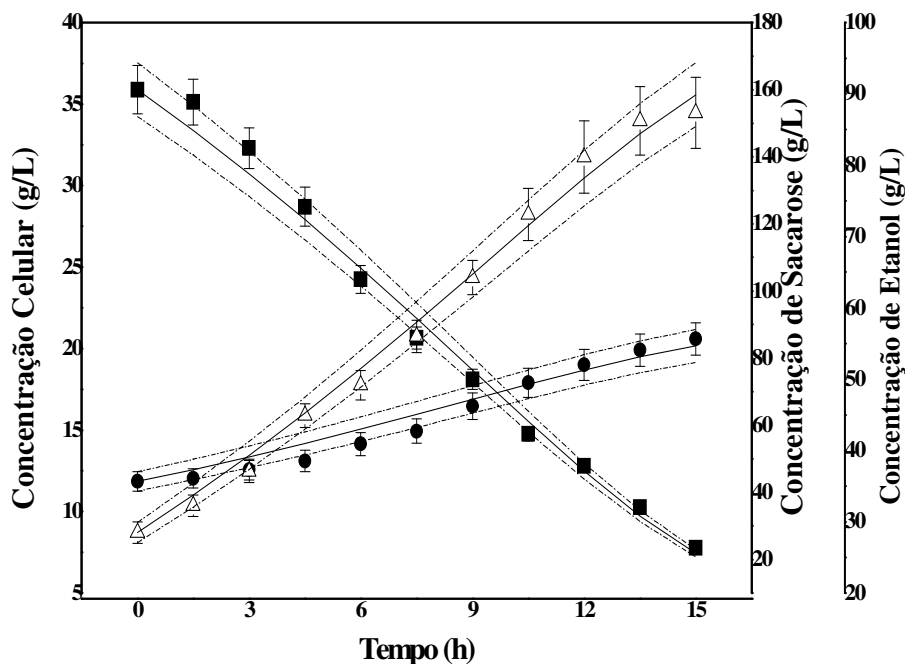


Figura 4.27 – Perfil da concentração celular (●), sacarose (■) e etanol (Δ) em função do tempo para o experimento com 160 g/L de concentração de sacarose e 4% (v/v) de concentração celular no reator. As linhas (—) representam o modelo aplicado aos dados experimentais. As linhas pontilhadas (---) representam a perturbação de $\pm 5\%$ no perfil simulado

4.6.1 Validação do modelo para a fermentação em batelada alimentada

Para verificar o comportamento do modelo para o processo em batelada alimentada foi usado o experimento nas condições ótimas do PCC, com concentração de sacarose de 170 g/L, concentração celular no inóculo de 40% (v/v) e tempo de enchimento em 6 horas. Os rendimentos de etanol e celular em relação ao consumo de

substrato foram calculados utilizando os valores experimentais. Na Tabela 4.11 estão apresentados os parâmetros obtidos a partir dos resultados experimentais.

Tabela 4.11 – Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo em batelada alimentada

Parâmetros	Dimensionais
Calculados pelos dados experimentais do processo em batelada alimentada	
$\mu_m [\text{h}^{-1}]$	0,080
$1/Y_{x/S} [\text{gS}/(\text{gX})]$	14,925
$1/Y_{x/P} [\text{gP}/(\text{gX})]$	6,849
$Ms[\text{gS}/(\text{gX.h})]$	0,015
Ajustados pelo modelo	
$P_{\text{máx}} [\text{g/L}]$	114,32
n	0,63
$K_S[\text{gS/L}]$	30,24
$K_I[\text{gS/L}]$	109,86

O perfil do enchimento do reator em 6 horas está apresentado na Figura 4.28.

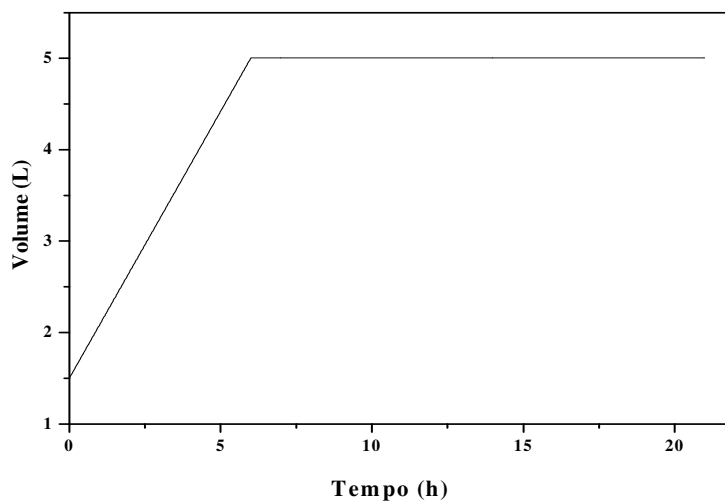


Figura 4.28 – Perfil do volume do reator em relação ao tempo

Os valores experimentais e o resultado predito pelo modelo para o reator batelada alimentada, em relação ao tempo estão apresentados na Figura 4.29.

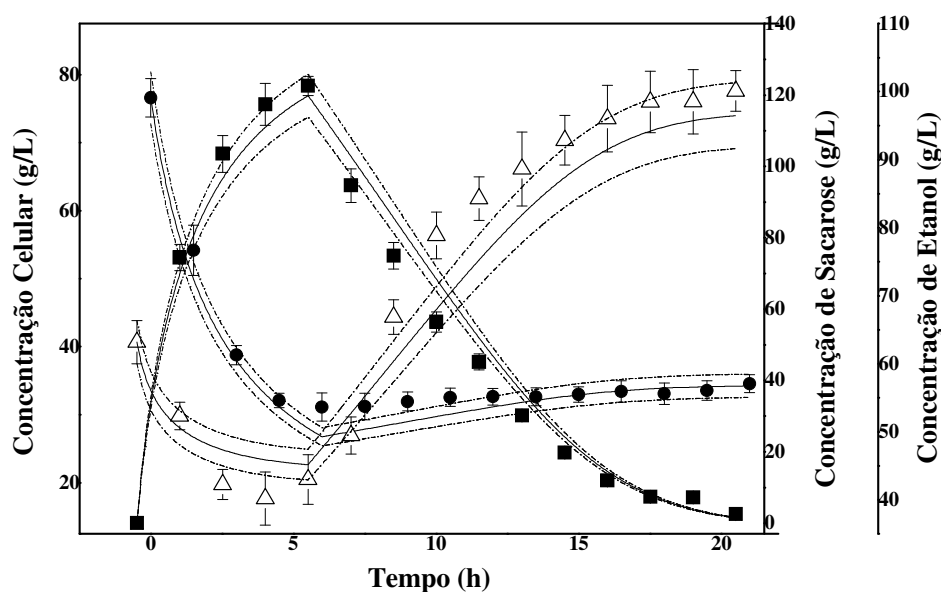


Figura 4.29 – Perfil da concentração celular (●), sacarose (■) e etanol (Δ) em função do tempo para o experimento com 170 g/L de concentração de sacarose, 12% (v/v) de concentração celular no reator e 6 horas de enchimento. As linhas (—) representam o modelo aplicado aos dados experimentais. As linhas pontilhadas (---) representam a perturbação de $\pm 5\%$ no perfil simulado

4.6.2 Validação do modelo para a fermentação em batelada alimentada com recirculação de meio fermentativo

Para avaliar a influência da “agitação”, com o da recirculação de células, do meio fermentativo no comportamento do processo em batelada alimentada, foi usado o Experimento F, conforme item 4.5. Este experimento apresentou as melhores condições de processo, com maior rendimento em etanol e produtividade. Esse experimento foi realizado nas condições de 170 g/L de sacarose, 50% (v/v) do inóculo e tempo de enchimento em 6 horas. Este experimento também foi utilizado para verificar a validação dos parâmetros cinéticos ajustados pelo processo com operação em batelada. Assim, os coeficientes de rendimento em etanol e celular em relação ao consumo de substrato foram calculados utilizando os dados experimentais e os demais parâmetros

foram os ajustados para o experimento em operação batelada. Na Tabela 4.12, estão apresentados os parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais e os ajustados pelo modelo.

Tabela 4.12 – Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo em batelada alimentada com recirculação

Parâmetros	Dimensionais
Calculados pelos dados experimentais do processo em batelada alimentada	
μ_m [h^{-1}]	0,182
$1/Y_{x/S}$ [$\text{gS}/(\text{gX})$]	12,410
$1/Y_{x/P}$ [$\text{gP}/(\text{gX})$]	5,854
Ms [$\text{gS}/(\text{gX.h})$]	0
b [$\text{gP}/(\text{gX.h})$]	0
Ajustados pelo modelo	
$P_{\text{máx}}$ [g/L]	114,32
n	0,63
K_s [gS/L]	30,24
K_I [gS/L]	109,86

O perfil do enchimento do reator durante o período de fermentação está apresentado na Figura 4.30.

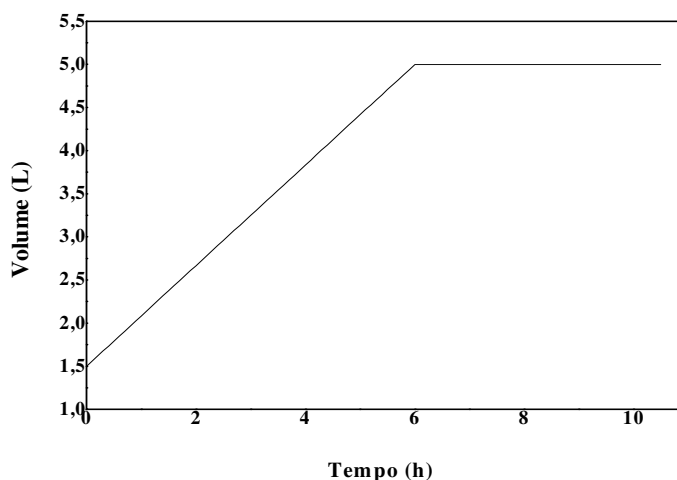


Figura 4.30 – Perfil do volume do reator em relação ao tempo para o experimento em batelada alimentada com recirculação

Os valores experimentais para o experimento em batelada alimentada com tempo de enchimento igual a 6 horas e o resultado predito pelo modelo estão apresentados na Figura 4.31.

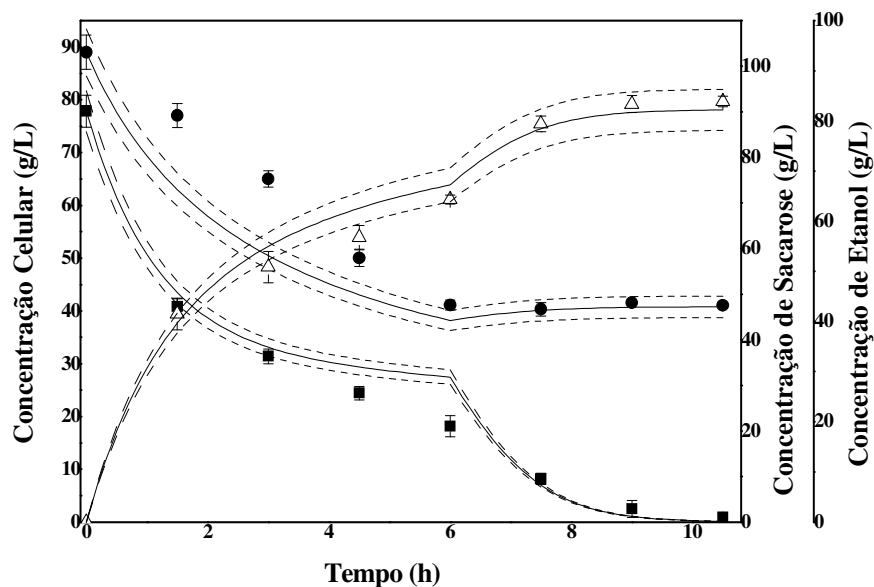


Figura 4.31 – Perfil da concentração celular (●), sacarose (■) e etanol (Δ) em função do tempo para o experimento com 170 g/L de concentração de sacarose, 15% (v/v) de concentração celular no reator e 6 horas de enchimento. As linhas (—) representam o modelo aplicado aos dados experimentais. As linhas pontilhadas (---) representam a perturbação de $\pm 5\%$ no perfil simulado

De acordo com a Figura 4.31 o modelo proposto conseguiu descrever bem o consumo de substrato e de formação de produto ao longo do processo fermentativo. A concentração celular só foi bem descrita pelo modelo após o enchimento do reator o que não invalida a utilização do modelo cinético, pois o mesmo conseguiu descrever muito bem as quatro últimas horas do processo fermentativo.

Uma análise dos valores de μ_{\max} para os experimentos em batelada, batelada alimentada e batelada alimentada com recirculação indica pouca variação entre os dois primeiros experimentos, mas quando se operou com a recirculação verificou-se um aumento significativo neste parâmetro, mostrando que a mistura causada pela recirculação aumentou o crescimento das leveduras. O mesmo comportamento foi verificado quando se analisou o rendimento celular $Y_{x/s}$. O $Y_{p/s}$ apresentou valores em

$\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ de 0,29 para o batelada, 0,46 para o batelada alimentada e 0,47 para o batelada alimentada com recirculação.

4.7 Perfil da produção máxima de etanol (P'máx)

Na Figura 4.32 estão apresentados os resultados do experimento da produção de etanol, crescimento celular e consumo do substrato em relação ao tempo (conforme item 3.2.2.7), visando determinar a produção máxima de etanol (P'máx). Pode-se perceber pela Figura 4.32, que após o tempo de 30 horas de fermentação, a levedura sofreu inibição pelo produto não consumindo mais substrato. A produção máxima de etanol foi de 110 g/L, aproximadamente 13,92% (v/v). Observa-se também que ao final da fermentação não houve crescimento da levedura, mantendo sua concentração inicial.

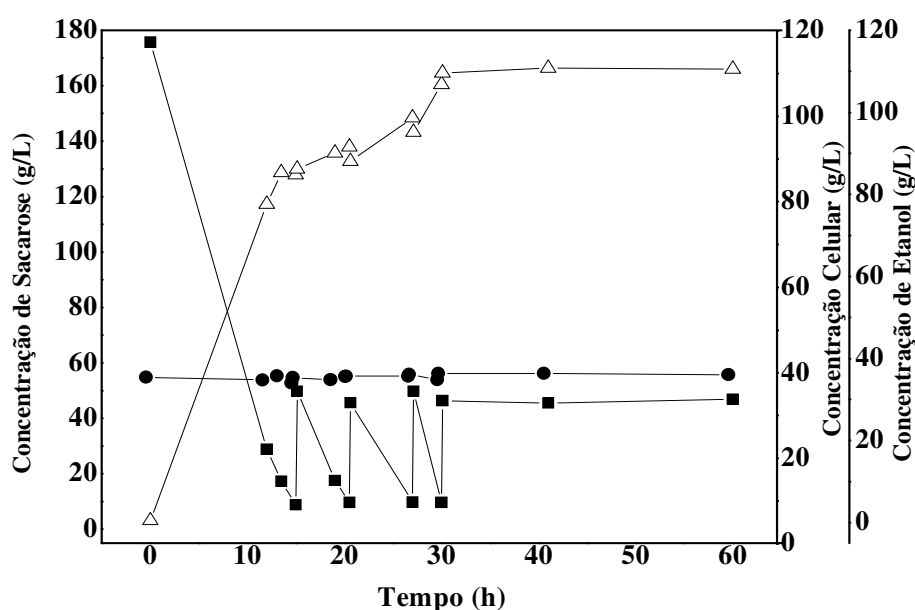


Figura 4.32 – Perfis de concentração de sacarose (■) e concentração de etanol (Δ), concentração celular (●) em função do tempo para o P'máx

Alguns pesquisadores relataram que a adição de etanol no meio de cultura foi menos tóxica para *S. cerevisiae* do que o etanol produzido pela fermentação alcoólica. Isto indica que existem outros subprodutos metabólicos, que podem causar inibição e podem apresentar impurezas no sistema de fermentação. As taxas de mortalidade, também foram mais baixas com a adição de etanol quando comparado com a

concentração de etanol produzido na fermentação alcoólica (NAJAFPOUR, 2004). Por esta razão, é preferível que os modelos cinéticos sejam desenvolvidos sob as condições de fermentação reais, o qual mostra que além do etanol outros produtos da fermentação podem agir como inibidores (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008).

4.8 Estudo da concentração máxima de etanol em que cessa o crescimento microbiano ($P_{\text{máx}}$)

Os micro-organismos podem ser inibidos pelos substratos próprios e/ou produtos. Os resultados do crescimento da levedura em diferentes concentrações de etanol estão apresentados na Tabela 4.13. Pode-se verificar que a concentração limitante de etanol foi de 12% (v/v), correspondendo a 94,8 g/L de etanol. Estes resultados indicam que a levedura C2/00 apresentou uma boa resistência ao etanol.

Tabela 4.13- Crescimento da levedura em diferentes concentrações de etanol

Cepa	Concentrações (% v/v)												
	0	3	6	9	12	12,5	13	13,5	14	14,5	15	18	21
C2/00	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-

4.9 Velocidade específica de sedimentação da levedura C2/00

Com os resultados de absorbância medidos em função do tempo, conforme experimento do item 3.2.2.8, foram realizados os cálculos de velocidade específica de sedimentação (VES) para cada valor de pH estudado. O cálculo foi realizado no tempo igual a 4 minutos. Este tempo foi escolhido pelo fato da sedimentação praticamente se tornar constante neste ponto para todos os perfis de sedimentação. Na Tabela 4.14 estão apresentados os valores calculados de velocidade específica de sedimentação para cada pH estudado.

Tabela 4.14- Velocidade específica de sedimentação em diferentes valores de pH para a levedura C2/00

pH	VES (min^{-1})
3	0,086
4	0,144
5	0,240
6	0,178
7	0,141

Analisando a Tabela 4.14, observa-se que a maior velocidade de sedimentação foi para o pH 5 de $0,240 \text{ min}^{-1}$. Já para valores de pH menor que 5 houve uma queda expressiva na velocidade de sedimentação. O pH final observado na fermentação alcoólica para a levedura C2/00 foi em torno de $4 \pm 0,1$. Uma alternativa para obter uma sedimentação mais eficiente para o processo seria ajustar, ao final da fermentação, o valor de pH para 5. Na Figura 4.33 estão apresentados os valores de Abs/Abs_0 em função do tempo para a levedura em diferentes valores de pH. Pela Figura 4.33 fica evidente a maior velocidade de sedimentação para o pH 5.

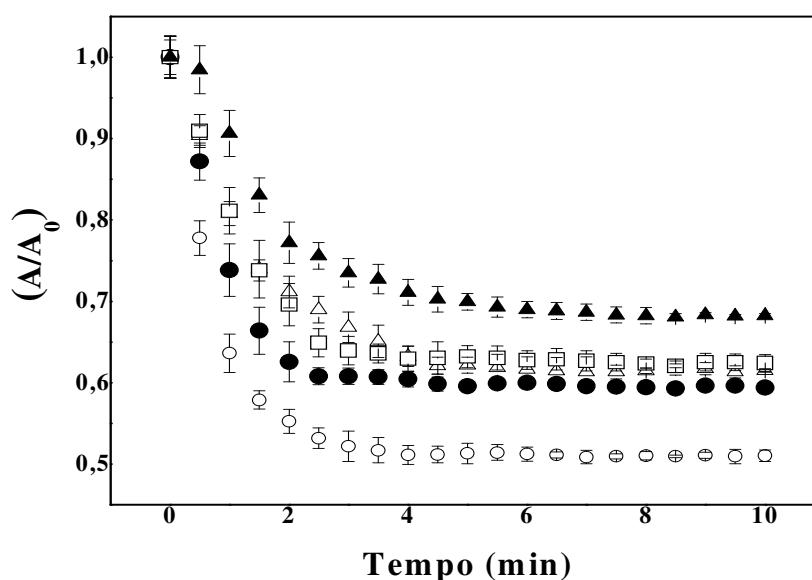


Figura 4.33 – Perfis de sedimentação em pH 3 (▲), pH4 (□), pH5 (○), pH6 (●) e pH 7 (Δ) em função do tempo

4.9.1 Sedimentação da levedura utilizando uma proveta em pH 5

A partir dos resultados obtidos da sedimentação em proveta da levedura C2/00, com valor de pH 5 do meio, foi ajustado o modelo descrito pela Equação 4.8. Este modelo descreveu a variação da altura da interface com o tempo para o cálculo da velocidade média de sedimentação. O perfil de velocidade foi calculado a partir da derivada da Equação 4.8 com o tempo a qual é descrito pela equação 4.9.

$$Y = a + b \cdot \exp\left(\frac{-x}{c}\right) \quad (4.8)$$

$$v = -\frac{b}{c} \cdot \exp\left(\frac{-x}{c}\right) \quad (4.9)$$

Sendo,

Y = Altura da interface em um tempo t (cm);

v = velocidade de sedimentação (cm/min);

X = tempo de sedimentação da levedura (min);

a, b, c = parâmetros da equação.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,99, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da velocidade de sedimentação, mostrando que 99% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação proposta. Os perfis de velocidade de sedimentação para o teste em proveta, perfil da altura da interface e o perfil do modelo proposto em função do tempo estão apresentados na Figura 4.34.

O cálculo de velocidade média de sedimentação foi realizado no tempo de 80 minutos, pois a partir desse tempo a velocidade se tornou praticamente constante. A velocidade média de sedimentação foi de 0,444 cm/min.

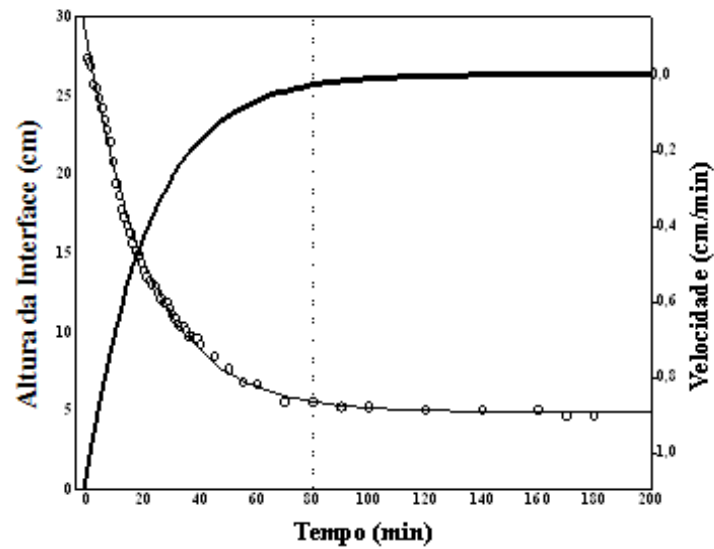


Figura 4.34 – Perfil do modelo da velocidade de sedimentação para o teste em proveta (—), perfil da altura da interface (○) e o perfil do modelo proposto (—) em função do tempo

Os resultados relativos à sedimentação da levedura serão de grande importância no dimensionamento do decantador a ser usado na separação do fermento em processos industriais.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

➤ A cepa C2/00 apresentou os melhores resultados no estudo da capacidade fermentativa, obtendo 0,50 g_p/g_s de coeficiente de rendimento e 3,60 g/L.h de produtividade. Os parâmetros de rendimento em etanol e produtividade são considerados os mais importantes para a indústria alcooleira;

➤ A levedura C2/00 apresentou colônia lisa, pelo estudo da característica fenotípica;

➤ As melhores condições selecionadas pela técnica de superfície de respostas para as variáveis estudadas foram: concentração de sacarose de 170 g/L, concentração celular no inóculo de 40% (v/v) e tempo de enchimento de 6 horas do reator batelada alimentada. Com estas condições obteve-se rendimento em etanol de $92,20 \pm 0,55\%$, produtividade de $6,01 \pm 0,12$ g/L.h e sacarose residual de $42,84 \pm 2,21$ g/L. O etanol produzido neste experimento foi de aproximadamente $63,07 \pm 3,83$ g/L em 10,5 horas de fermentação;

➤ Os resultados do estudo da influência derecirculação de células, concentração de etanol e sacarose no inóculo, mostrou que o experimento que obteve os melhores resultados no processo fermentativo em batelada alimentada neste trabalho, foi o Experimento F. O experimento F foi realizado praticamente nas mesmas condições ótimas do PCC, porém foi realizada a recirculação de células durante toda a fermentação. O inóculo iniciou sem etanol, com substrato e a concentração celular no inóculo foi de 50 % (v/v). Os resultados obtidos foram: 92,75% de eficiência, 9,26 g/L.h de produtividade, 2,9 g/L de concentração de sacarose residual e concentração de etanol produzido foi de 83,37 g/L em 9 horas de processo fermentativo;

➤ O modelo cinético de Tosetto e Andrietta (2002) se ajustou bem aos dados experimentais. Houve uma boa correlação entre os valores experimentais e os valores obtidos;

➤ A produção máxima de etanol ($P'_{\text{máx}}$) para a levedura C2/00 foi de 110 g/L, sendo aproximadamente 13,92% (v/v);

➤ Os resultados do crescimento da levedura em diferentes concentrações de etanol ($P_{\text{máx}}$) resultou em uma concentração limitante de etanol de 12,5% (v/v), correspondendo a 94,8 g/L de etanol. Estes resultados indicam que a levedura C2/00 obteve uma boa resistência ao etanol.

➤ A velocidade específica de sedimentação para a levedura C2/00 em pH foi de $0,240 \text{ min}^{-1}$. A velocidade de sedimentação para o teste realizado em proveta foi de 0,444 cm/min. Pelos resultados obtidos, observou-se uma boa velocidade de sedimentação para a levedura C2/00 o que viabiliza o seu uso industrial.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a eficiência fermentativa das leveduras em função do número de ciclos de fermentação;
- Avaliar a fermentação alcoólica com alta concentração celular (VHG) em termos de inibição pelo substrato e inibição pelo produto;
- Estudar a influência da composição do meio fermentativo em relação ao estresse celular e em relação à floculação;
- Avaliar a contaminação bacteriana no processo em batelada alimentada.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical Engineering**. Second edition. New York, 1973.

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, p. 845–864, 1968.

AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência & Tecnologia**. Fermentec, Piracicaba, p. 448, 2005.

AMORIM, H. V; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento**. FERMENTEC, Piracicaba, p. 56-59, 1996.

ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of micro-organisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, p.707–723, 1968.

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial**. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos**, v. 17, p. 54 – 59, 1999.

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. D. S. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3002–3008, 2008.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983.

ASTOLFI, V.; JORIS, J.; VERLINDO, R.; OLIVEIRA, J. V. MAUGERI FILHO, F.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D. TREICHEL, H. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid- state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 39-49, 2011.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89–105, 2008.

BAILEY J. E.; OLLIS D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Second edition. New York, 1986.

BAPTISTA, C. M. S. G.; CÓIAS J. M. A.; OLIVEIRA, A. C. M.; OLIVEIRA, N. M. C.; ROCHA, J. M. S.; DEMPSEY, M. J.; LANNIGAN, K. C.; BENSON, P. S. Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 127–131, 2006.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BORZANI, W; SCHMIDELL, W; LIMA, U; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: Fundamentos**. E. Blücher, São Paulo, v. 1, 2001.

BRASILAGRO. Projeção menos positiva para os biocombustíveis. Disponível em <<http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/11/48995>>. Acesso em 05/02/2012.

CAETANO, A. C. G; LEONARDO, L. M. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v. 2, p. 27-37, 2011.

CALLEJA, G. B. **Cell Aggregation**. In *The Yeast*, ed. A.H. Rose and J. S. Harrison, London, 1987.

CAMPBELL, I. **Wild Yeasts in Brewing and Distilling**. *Brewing Microbiology*, Aspen Publishers, USA, 1999.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415–2457, 2007.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, v. 2, p. 193-204, 2001.

CAZZADOR, L.; LUBENOVA, V. Nonlinear estimation of specific growth rate for aerobic fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 626 - 632, 1995.

CHOI, G. W.; UMB, H. J.; KANG, H. W.; KIM, Y.; KIM, M.; KIM, Y. H. Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1232 – 1242, 2010.

CLARO, F. B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E. V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 693–700, 2007.

DARÉ, R. M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol**. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, 2008.

DIAS, M. O. S. **Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço**. 253 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in rate of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* during batch fermentation, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 98, 1988.

DOMINGUES, L. **Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a utilização da lactose: Construção e Aplicação Biotecnológica**. 307 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus niger* b-galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1151–1154, 2005.

DOMINGUES, L.; VICENTE, A. A.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Applications of yeast flocculation in biotechnological processes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, p. 288–305, 2000.

DOMINGUES, L.; GUIMARÃES, P. M. R.; OLIVEIRA, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 164 – 171, 2010.

EDDY, A. A; PHIL, M. A. D. Composite nature of the flocculation process of top and bottom strains of *Saccharomyces*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 64, p. 143-151, 1958.

ESSER, K.; KÜES, U. Flocculation and its implication in biotechnology. **Process Biochemistry**, v. 18, p. 21-23, 1983.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 223-246, 2001.

FERNANDES A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺ ATPase da membrana plasmática.** 201 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

FINGUERUT, J. I. **Workshop Brasileiro sobre Obtenção de Etanol.** Projeto PPPP Etanol. Centro de Tecnologia Canavieira, 2006.

FREITAS, C. **Estudos hidrodinâmicos num reactor “Airlift” com zona de decantação.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 1996.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. **Energy – yielding metabolism. In: Rose A. H., Harrison J. S. (eds) The yeasts.** Metabolism and Physiology of Yeast, Academic, London, p. 205 – 259, 1989.

GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolisate I. Batch versus continuous systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 1387-1400, 1979.

GILL, S. A process for the step-by-step integration of differential equations in an automatic digital computing machine. **Proc. Cambridge Philos. Soc.**, 47, p. 96-108, 1951.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086–2097, 2008.

GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Plasmid-mediate transfer of FLO1 into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation–sedimentation. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 162–168, 2012.

GOUVEIA, C. SOARES, E.V. Pb^{2+} inhibits competitively flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, p. 141–145, 2004.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375–384, 2010.

HE, L. Y.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the FLO1-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production. **Applied Energy**, v. 100, p. 33–40, 2012.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, p. 2450–2456, 2009.

JIN, Y.; RITCEY, L. L.; SPEERS, R. A. Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymoelectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, p. 1–9, 2001.

JIN, Y. L.; SPEERS, A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v.31, p. 421-440, 1999.

JONES, R. P. Measures of yeast death and deactivation and their meaning: part I. **Process Biochemistry**, v. 22, p.118 - 128, 1987.

KIHN, J. C.; MASY, C. L.; MESTDAGH, M. M. Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. **Canadian Journal Microbiology**, v. 34, p. 773-778, 1988.

KOBAYASHI, O.; HAYASHI, N.; KUROKI, R.; SONE, H. Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. **Journal Bacteriology**, v. 180, p. 6503–6510, 1998.

KRUPPA, M.; GOINS, T., CUTLER, J. E., LOWMAN, D., CHAUHAN, N., MENON, V., SINGH, P., LI, D., CALDERONE, R. The role of *Candida albicans* histidine kinase (CHK1) gene in the regulation of cell wall mannan and glucan biosynthesis. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 289 – 299, 2003.

LAVADO, A. L. C. **Os atuais desafios da energia. Implementação e utilização da energias renováveis.** 58 f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologias do ambiente) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 29-48, 1999.

LEVENSPIEL, O. The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 1671–87, 1980.

LI, A. H.; LIN, C. W.; TRAN, D. T. Optimizing the response surface for producing ethanol from avicel by *Brevibacillus* strain AHPC8120. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 787–792, 2011.

LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology Biotechnology**, v, 84, p. 1079–1086, 2009.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDEL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Biotecnologia Industrial**, v.3, p.1-43, 2001.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira.** Curitiba: Editora UFPR, 248p., 2002.

LIU, C. Z.; WANG, F.; OU-YANG, F. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. **Bioresource Technology**, v.100, p. 878–882, 2009.

LUDWIG, K. M. **Floculação de *S. cerevisiae* – caracterização e ação de enzimas desfloculantes**. 134 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências de Rio Claro – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

LUO, L.; VOET, E. van der.; HUPPES, G. Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1613–1619, 2009.

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, p. 280–285, 1985.

MA, K.; WAKISAKA, M.; SAKAI, K., SHIRAI, Y. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2289–2292, 2009.

MACHADO, M. D.; SANTOS, M. S. F.; GOUVEIA, C.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: The flocculation as a separation process. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2107–2115, 2008.

MALTA, H. L. **Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

MARQUARDT, D. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **SIAM Journal on Applied Mathematics** 11: 431-441, 1963.

MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H.; UEDA, M.; TANAKA, A.; KONDO, A. Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4517 – 4522, 2002.

MICHEL JUNIOR, R. J. S. **Obtenção do álcool etílico hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo: validação de um processo em batelada.** 146 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MIGLIARI, P. **Classificação das cepas de leveduras dominantes de processos fermentativos utilizando parâmetros fermentativos e taxonomia numérica.** 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2001.

MIKI, B. L. A.; POON, N. H.; JAMES, A. P.; SELIGY, V. L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Bacteriology**, v. 150, p. 878–889, 1982.

MISSAWA, S. K. **Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional.** 150 f. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes.** 1.ed. Jaboticabal: Funep, p.539-570, 2006. .

MULDERS, S. E. V.; CHRISTIANEN, E.; SAERENS, S. M. G.; DAENEN, L.; VERBELEN, P.J.; WILLAERT, R.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. Phenotypic diversity of Flo protein family mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 178–190, 2009.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 92-251, 2004.

NISHIHARA, H.; KIO, K.; IMAMURA, M. Possible mechanism of co-flocculation between non-flocculent yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, p. 7-10, 2000.

NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effects of metal ions, protein-denaturants and enzyme treatments. **Archives of Microbiology**, 131: 112-115, 1982.

NOVACANA. **EUA fazem projeção sobre o futuro do mercado de etanol**. Disponível em <<http://www.novacana.com/n/etanol/mercado/futuro/eua-projecao-futuro-mercado-etanol-190213/>>. Acesso em 05/03/2013.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 207 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Role of finger millet (*Eleusine coracana* L.) flour. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 726–729, 2006.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para a produção de etanol**. 80 f. Dissertação

(Mestre em Ciências, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

ROLZ, C.; LEÓN, R. Ethanol fermentation from sugarcane at different maturities. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 333–337, 2011.

ROMÃO, B. B. **Produção de etanol por hidrólise ácida de melaço de soja**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SANTOS, A. M. **Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica, v. 2, p. 179-192, 2001.

SCHULZ, M. A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

SENGUPTA, S; MODAK, J. M. Optimization of fed-batch bioreactor for immobilized enzyme processes. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 3315 – 3325, 2001.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhock**, v. 88, p. 13-23, 2005.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J. L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at

laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8156–8163, 2008.

SIPSAS, V.; KOLOKYTHAS, G.; KOURKOUTAS, Y.; PLESSAS, S.; NEDOVIC, V. A.; KANELLAKI, M. Comparative study of batch and continuous multi-stage fixed-bed tower (MFBT) bioreactor during wine-making using freeze-dried immobilized cells. **Journal of Food Engineering**, v. 90, 495–503, 2009.

SMEETS, E.; JUNGINGER, M.; FAAIJ, A.; WALTER, A.; DOLZAN, P.; TURKENBURG, W. The sustainability of Brazilian ethanol—An assessment of the possibilities of certified production. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 781 – 813, 2008.

SMIT, G.; STRAVER, M. H.; LUGTENBERG, B. J. J.; KIJNE, J. W. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydro- phobicity as a major determinant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3709 - 3714, 1992.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1–18, 2010.

SOARES, E. V.; DUARTE, A. A. Addition of nutrients induce a fast loss of flocculation in starved cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1957–1960, 2002.

SOARES, E. V.; TEIXEIRA, J. A.; MOTA, M. Influence of aeration and glucose concentration in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 207-212, 1991.

SOARES, E. V.; VROMAN, A. Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 325–330, 2003.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan IPT, São Paulo, 2009.

SPEERS, R. A.; TUNG, M. A.; DURANCE, T. D.; STEWART, G. G. Colloidal aspects of yeast flocculation: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 98, p. 525-531, 1992.

SRIYUDTHSAK, K. SHIRAISHI, F. Investigation of the performance of fermentation processes using a mathematical model including effects of metabolic bottleneck and toxic product on cells. **Mathematical Biosciences**, v. 228, p. 1–9, 2010.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2001.

STEWART, G.G. The Horace Brown Medal lecture: forty years of brewing research. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, p. 3–29, 2009.

STRATFORD, M. Yeast flocculation – a new perspective. **Advances in Microbial Physiology**, v. 33, p. 1–71, 1992.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. **Yeast**, v. 5, p. 487-496, 1989.

STRATFORD, M; KEENAN, M. H. J. Yeast flocculation: quantification. **Yeast**, v. 4, p. 107-115, 1988.

TANG, Y. Q.; AN, M. Z.; ZHONG, Y. L.; SHIGERU, M.; WU, X. L.; KIDA, K. Continuous ethanol fermentation from non-sulfuric acid-washed molasses using traditional stirred tank reactors and the flocculating yeast strain KF-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 41–46, 2010.

TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; SOUSA, M.; SIL, C. Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 5, p. 197-203, 1995.

TEUNISSEN, A. W. R. H. STEENSMA, H. Y. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. **Yeast**, v. 11, p. 1001– 1013, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6.ed. Tradução. Porto Alegre, 2000.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

TOSETTO, G. M.; ANDRIETTA, S. R. Influência da matéria prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. **VII Seminar on Enzymatic Hidrolysis of Biomass – SHEB**, Maringá, 2002.

UDOP- União dos produtores de Bioenergia. **Retomada: US\$ 65 bi investidos em novas usinas renderão US\$ 62 bi em impostos**. Disponível em <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1082044#nc>>. Acesso em 05/03/2013.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Setor Sucroenergético – Histórico**. Disponível em <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=11891360-41CC-459C-9A22-191506941834>>. Acesso em 22/10/2012.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Indústria brasileira de cana-de-açúcar: uma trajetória de evolução**. Disponível em <<http://www.unica.com.br/linhadotempo/linhadotempo.html>>. Acesso em 26/10/2012.

VEERAMALLU, U.; AGRAWAL, P. A structured kinetic model for *Zymomonas mobilis* ATC10988. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 694 - 704, 1990.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation yeasts. *Molecular Microbiology*, v. 60, p. 5–15, 2006.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VIEGAS, M. C. **Desenvolvimento de um reator de bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras floculantes**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

VIEGAS, M. C.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; Use of tower reactors for continuous ethanol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.167-173, 2002.

WANG, B.; GE, X. M.; LI, N.; BAI, F. W. Continuous ethanol fermentation coupled with recycling of yeast flocs. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 816-820, 2006.

WANG, F. S.; SHEU, J. W. Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 3685 – 3695, 2000.

WU, L.; LI, Y.; ARAKANE, M.; IKE, M.; WADA, M.; TERAJIMA, Y.; ISHIKAWA, S.; TOKUYASU, K. Efficient conversion of sugarcane stalks into ethanol employing low temperature alkali pretreatment method. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 11183–11188, 2011.

XU, T. J.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 634–640, 2005.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, v.22, p.12-16, 1991.

ZARATTINI, R. A.; WILLIAMS, J. W.; ERNANDES, J. R.; STEWART, G. G. Bacterial-induced flocculation in selected brewing strains of *Saccharomyces Cerevisiae*, v. 4,; p. 65-70, 1993.

ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação Contínua para Produção de Álcool. STAB Açúcar e Álcool e Subprodutos, p. 23-28, 1992.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 849–856, 2009.

ZHAO, X. Q.; LI, Q.; HE, L. Y.; LI, F.; QUE, W. W.; BAI, F. W. Exploration of a natural reservoir of flocculating genes from various *Saccharomyces cerevisiae* strains and improved ethanol fermentation using stable genetically engineered flocculating yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1612–1619, 2012.

CAPÍTULO 8

ANEXO

Anexo (A1): Agar de contagem

- Componente/Concentração (g/L);
- KH_2PO_4 : 1,0g;
- NaCl: 5g;
- Extrato de carne: 3g;
- Peptona: 10g;
- Agar: 15g;
- Nistatina: 0,02 g/L;
- pH do meio: 7,5.

Anexo (A2): Meio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Medium)

- Quantidade para 100 mL:

Glicose	5,0000 g	
KH_2PO_4	0,0550 g	(a)
KCl	0,0425 g	(b)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0125 g	(c)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0125 g	(d)
$\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2500 mg	(e)
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2500 mg	(f)
Caseína hidrolisada enzimaticamente	0,5000 g	
Extrato de levedura	0,4000 g	
Agar	2,0000 g	
Verde de Bromocresol	0,0022 g	(g)
Ácido Nalidíxico	5,0000 mg	(h)
Ampicilina	5,0000 mg	(i)

O pH foi acertado em $5,5 \pm 0,1$.

Observação: Os componentes a, b, c, d, e, f, g, h, i foram adicionados na forma de solução.

- Solução de KH_2PO_4 - 5,5 g/100 mL. Foi usado 1 mL para 100 mL de meio.
- Solução de KCl - 4,25 g/100 mL. Foi usado 1 mL para 100 mL de meio.
- Solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1,25 g/100 mL. Foi usado 1 mL para cada 100 mL de meio.
- Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,25 g/100 mL. Foi usado 1 mL para cada 100 mL de meio.

Solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/200 mL. Foi usado 0,1 mL para cada 100 mL de meio (2,5 mg/mL ou 0,15 mL de solução com 1,625 mg/mL para cada 100 mL de meio).

- Solução de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g/200 mL. Foi usado 0,1mL para cada 100 mL de meio.
- Verde de bromocresol - 200 mg/100mL. Foi dissolvido em 5 mL de álcool e e completado com 100 mL de água. Usou-se 1 mL para cada 100 mL de meio.
- Solução de ampicilina – Diluiu-se um comprimido de 500 mg de ampicilina em água destilada, completando o volume a 100 mL. Usou-se 1 mL para 100 mL de meio.
- Solução de ácido nalidíxico – Diluiu-se um comprimido de 500 mg de ácido nalidíxico em solução de NaOH 0,05N completando o volume a 100 mL.

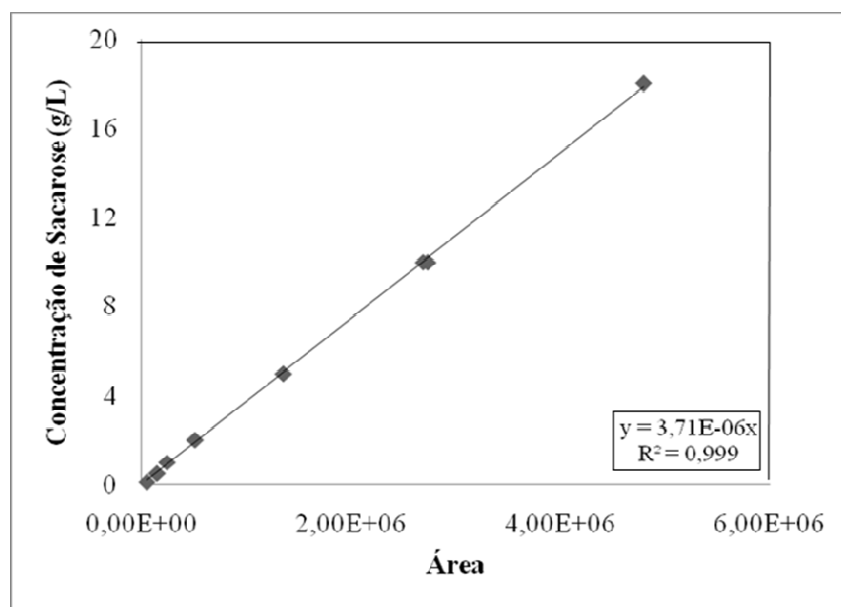
Anexo (A3): Meio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)

- Componente/Concentração (g/L);
- Extrato de levedura: 10g;
- Peptona: 20g;
- Dextrose: 20g;
- Ágar: 20g.

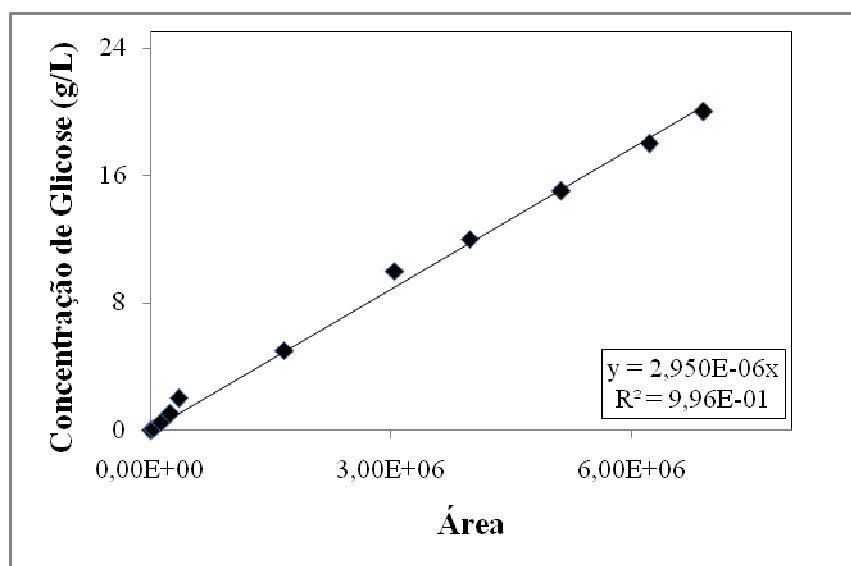
CAPÍTULO 9

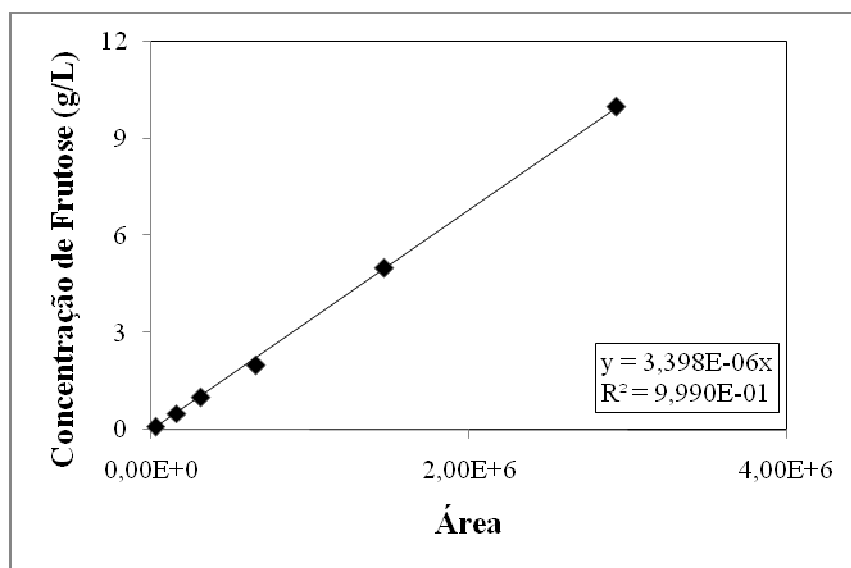
APÊNDICE

Apêndice (A1): Curva de calibração para a concentração de sacarose



Apêndice (A2): Curva de calibração para a concentração de glicose



Apêndice (A3): Curva de calibração para a concentração de frutose**Apêndice (A4): Curva de calibração para a concentração de etanol**