



Universidade Federal de Uberlândia

Faculdade de Engenharia Química

Programa de Pós Graduação em Engenharia Química



**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EMPREGANDO LEVEDURAS  
FLOCULANTES EM SISTEMA DE REATORES TORRE**

**Líbia Diniz Santos**

Uberlândia - MG

2014





Universidade Federal de Uberlândia

Faculdade de Engenharia Química

Programa de Pós Graduação em Engenharia Química



**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EMPREGANDO LEVEDURAS  
FLOCULANTES EM SISTEMA DE REATORES TORRE**

Líbia Diniz Santos

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 para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

Uberlândia - MG

2014

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 18 DE FEVEREIRO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dr. Vicielma Luiz Cardoso  
Co-orientadora (PPGEQ/UFU)

Prof. Dr. Juliana de Souza Ferreira  
(PPGEQ/UFU)

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

Prof. Dr. Susana Juliano Kalil  
(PPG-ECA/FURG)

Prof. Dr. Eliana Setsuko Kamimura  
(FZEA/USP)

*Dedico em especial a Deus por estar sempre ao meu lado tornando tudo isso possível, aos meus pais que foram a base, a força e o amor necessário, aos meus irmãos que não mediram esforços para me apoiar e me encorajar em todas etapas e em especial minha filha Vallentina, grande amor da minha vida, que com seu carinho e compreensão fez toda diferença nessa caminhada.*

*Muito Obrigada*

---

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus por ser meu mentor e permitir mais uma etapa de crescimento e aprendizado, pela sabedoria espiritual tão importante durante as fases deste trabalho, pelo amparo e amor incondicional.

Aos meus amados pais, Nelton e Ana Alice, pela força e auxílio emocional, pela ajuda com minha filha Vallentina que tanto foi necessária, permitindo a realização desse trabalho. 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 preocupação dominei pai com o foco que eu sempre deverei dar a esta realização, tão importante para minha formação profissional.

A minha filha Vallentina a quem dedico esse trabalho, que tantas vezes teve compreensão e respeito a essa etapa de minha vida. Por ser amorosa, carinhosa e cuidadosa, sempre rezando para que os "bichinhos crescessem". A minha irmã Lara que nunca mediu esforços para me ajudar no que era preciso. Meu irmão Lucas e cunhada Paula que sempre estiveram em oração e torcida. À toda minha família o meu eterno amor e gratidão.

Ao meu querido orientador, mestre e amigo, Professor Eloízio Júlio Ribeiro, os maiores e mais sinceros agradecimentos, com quem aprendi muito nesses mais de treze anos de convivência. Que me recebeu no segundo ano de graduação e com seu profissionalismo me fez crescer e aprender muito com seus ensinamentos acadêmicos e pessoais. Saiba que desperta em mim grande admiração e respeito.

À professora Vicelma Luiz Cardoso, pela paciência, amizade, disponibilidade e solicitude constante. Pela sua força, otimismo e garra na obtenção dos resultados, que muitas vezes pareciam quase impossíveis. Seu amparo e incentivo foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos professores da FEQUI, em especial à professora Miriam Maria de Resende, pelo apoio e carinho que sempre me tratou.

Aos meus colegas de trabalho do curso de Engenharia de Alimentos do Campus de Patos de Minas que com compreensão e respeito permitiram a execução desse trabalho.

Aos profissionais que gentilmente aceitaram o convite para comporem a banca examinadora e contribuírem com o enriquecimento desse estudo.

Aos funcionários da FEQUI: Humberto, Cecilia, Silvino, Tiago, Gabriel, Édio, Paulo, Roberta e Cleuzilene pela disposição e prontidão em ajudar-me sempre que precisei. Aos alunos de iniciação científica Marina, Maria Silvia, Larissa e Annelise 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, sempre disponíveis a contribuir e ajudar.

Ao CNPq 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 importante etapa...

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELA .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>5</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Biocombustível.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Etanol .....	6
<b>2.2 Formas de condução da fermentação alcoólica .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Processos descontínuos – Bateladas .....	9
2.2.3 Processo contínuo .....	11
<b>2.3 Biorreatores.....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Reatores torres.....	15
<b>2.4 Características bioquímicas da fermentação alcoólica .....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Fatores que afetam a fermentação alcoólica .....	20
2.4.2 Leveduras floculantes .....	23
<b>2.5 Capacidade fermentativa .....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>28</b>

<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Unidade experimental.....	29
3.1.2 Micro-organismos.....	31
3.1.3 Meio de cultura.....	31
<b>3.2     Metodologias .....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Análise das concentrações de açúcares e álcool .....	32
3.2.2 Concentração e viabilidade celular de leveduras.....	32
3.2.3 Quantificação de bactérias (técnica da microgota) .....	33
<b>3.3 Capacidade fermentativa .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Estudo da morfologia das cepas .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5 Estudo da influência do pH no desempenho da cepa C2/00 .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6 Influência da temperatura na floculação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (C2/00) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.7 Influência da agitação na floculação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (C2/00) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.8 Velocidade específica de sedimentação.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9 Estudo da influência do pH na velocidade de sedimentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> C2/00 .....</b>	<b>39</b>
<b>3.10 Estudo da velocidade de sedimentação em proveta.....</b>	<b>39</b>
<b>3.11 Sistema de fermentação em batelada.....</b>	<b>40</b>
3.11.1 Estudos da fermentação em um reator tipo torre em batelada .....	40
3.11.2 Estudo da utilização de antibiótico natural e comercial para controlar a contaminação da fermentação alcoólica com leveduras floculantes .....	41
<b>3.12 Utilização de fermentadores torre em série em operação contínua.....</b>	<b>41</b>
3.12.1 Testes preliminares.....	42
<b>3.13 Planejamentos Composto Central.....</b>	<b>43</b>
<b>3.14 Caracterização hidrodinâmica dos reatores .....</b>	<b>45</b>

<b>3.15 Teste da influência da concentração de melaço na floculação e no rendimento da fermentação alcoólica .....</b>	<b>48</b>
<b>3.16 Fermentações em reatores contínuos com caldo de cana.....</b>	<b>49</b>
<b>3.17 Estabilidade da fermentação alcoólica no sistema contínuo.....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Avaliação da capacidade fermentativa.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Resultados do estudo da morfologia das cepas .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Influência do pH no comportamento da cepa C2/00.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4 Influência da temperatura no comportamento da cepa C2/00.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5 Influência da agitação na floculação de leveduras .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6 Estudos da velocidade de sedimentação das células.....</b>	<b>60</b>
4.6.1 Velocidade específica de sedimentação.....	60
4.6.2 Influência do pH na velocidade de sedimentação.....	60
4.6.3 Velocidade de sedimentação no teste de proveta.....	62
<b>4.7 Estudo da fermentação em batelada utilizando um reator tipo torre .....</b>	<b>63</b>
<b>4.8 Efeito do uso de antibióticos para controlar contaminação em fermentação com a cepa C2/00 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.9 Testes para definir as condições de processo do sistema de reatores torre em série..</b>	<b>74</b>
4.9.1 Período de adaptação.....	74
4.9.2 Fermentação contínua em série, tempos de residência de 12 e 17 horas e concentração de alimentação 180 g/L de sacarose a pH 6,0.....	75
4.9.3 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0, tempo de residência de 10 horas e 125 g/L de sacarose na alimentação do sistema .....	78
4.9.4 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0 e tempo de residência de 10 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema .....	78
4.9.5 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0, tempo de residência de 6 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema .....	78

4.9.6 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0, tempo de residência de 6 horas, 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema e 3g/L de extrato de levedura .....	79
4.9.7 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 6 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema .....	79
4.9.8 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 14 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema .....	80
4.9.9 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 12 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema .....	80
4.9.10 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 12 horas, 180 g/L de sacarose e metade da quantidade de células em relação ao experimento anterior .....	80
<b>4.10 Planejamento Composto Central .....</b>	<b>83</b>
4.10.1 Analise dos resultados obtidos para a resposta rendimento total em etanol das variáveis estudadas .....	85
4.10.2 Analise dos resultados obtidos para a resposta produtividade em função das variáveis estudadas. ....	91
4.10.3 Analise dos resultados obtidos para a resposta do açúcar redutores totais (ART) das fermentações com as variáveis estudadas .....	97
<b>4.11 Caracterização hidrodinâmica do sistema de reatores .....</b>	<b>105</b>
<b>4.12 Efeito da concentração de melaço na fermentação alcoólica com leveduras floculantes.....</b>	<b>107</b>
<b>4.13 Testes com caldo de cana no sistema de reatores .....</b>	<b>109</b>
<b>4.14 Estudo da estabilidade do processo fermentativo em reatores torres em série .....</b>	<b>110</b>
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>5.1 Conclusões .....</b>	<b>111</b>
<b>5.2 Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>112</b>
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>114</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 2.1 - Dois reatores torres (o autor) .....	16
Figura 2.2 – Esquema da fermentação e da respiração Fonte:(CUNHA, 2004) .....	18
Figura 2.3 – Rota metabólica do <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
Figura 2.4 - Células floculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observadas em microscopia eletrônica de varrimento (barra corresponde a 10 $\mu$ m). Fonte: (DOMINGUES, 2001). .....	24
Figura 2.5 - 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. Fonte: Soares (2010).....	25
Figura 3.1 - Sistema de fermentação em batelada utilizando um reator torre de 3L de volume útil. ....	29
Figura 3.2 - Fermentador Biostat M B. Braun.....	30
Figura 3.3 - Sistema de fermentação de dois reatores torres conectados em série com decantadores. (1 – tanque de alimentação; 2 – bomba; 3 – primeiro reator; 4 – decantador; 5 – segundo reator; 6 – tanque de vinho).....	31
Figura 3.4 - Esquema dos ensaios experimentais preliminares ( fermentadores de 75 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro interno, sendo 3 L de volume útil cada). ....	43
Figura 3.5 - Sistema 1 da fermentação alcoólica. ....	46
Figura 3.6 - Sistema 2 da fermentação alcoólica. ....	47
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.....	51
Figura 4.2 – Morfologia lisa das cepas estudadas. ....	53
Figura 4.3 – Morfologia lisa da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> C2/00.....	53
Figura 4.4 – Comportamento da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> C2/00 de acordo com o pH. ....	55
Figura 4.5 - Representação da influência da temperatura do tamanho dos flocos da cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> C2/00.....	57
Figura 4.6: Influência da agitação na formação de flocos. ....	59
Figura 4.7 – Perfis de sedimentação em pH 3 ( $\blacktriangle$ ), pH4 ( $\square$ ), pH5 ( $\circ$ ), pH6 ( $\bullet$ ) e pH 7 ( $\Delta$ ) em função do tempo .....	61
Figura 4.8 – Perfil do modelo da velocidade de sedimentação para o teste em proveta (—), perfil de posição do micro-organismo ( $\circ$ ) e o perfil do modelo proposto (—) em função do tempo.....	63
Figura 4.9 - Esquema de um reator torre trabalhando em batelada. ....	64

Figura 4.10 – Perfis cinéticos relativos ao consumo de sacarose (■), concentração celular (●) e produção de etanol (▲) com vazão de 6 mL/s.....	64
Figura 4.11 – Reator torre em batelada com uma vazão de recirculação de 6 mL/s.....	65
Figura 4.12 – Perfis cinéticos relativos ao consumo de sacarose (■), concentração celular (●) e produção de etanol (▲) com vazão de 30 mL/s.....	65
Figura 4.13 – Reator torre em batelada com uma vazão de recirculação de 30 mL/s.....	66
Figura 4.14 - Fermentação com 160 g/L de sacarose sem contaminação induzida. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	68
Figura 4.15 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação induzida. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	68
Figura 4.16 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 3 ppm de Kamoran. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	69
Figura 4.17 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 6 ppm de Kamoran. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	69
Figura 4.18 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 35 ppm de Beta-Bio. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	71
Figura 4.19 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 50 ppm de Ampicilina. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	72
Figura 4.20 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 50 ppm de Ácido nalidíxico. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias (*) e produção de etanol (▲).....	72
Figura 4.21 – Comportamento dos leitos de célula nos reatores torres com pH do meio de alimentação igual a 6.....	75
Figura 4.22 - Esquema dos ensaios experimentais preliminares. ....	76
Figura 4.23 - Dois fermentadores torres com entupimento pelas células. ....	81
Figura 4.24 - Dois fermentadores torres com decantadores intermediários.....	82
Figura 4.25 - Sistema de fermentação de dois reatores torres conectados em série com decantadores. (1 – tanque de alimentação; 2 – bombas; 3 – primeiro reator; 4 – decantadores; 5 – segundo reator; 6 – tanque de vinho). ....	83

Figura 4.26 - Distribuição de resíduos relativos ao rendimento total. ....	88
Figura 4.27 - Valores preditos em relação aos observados em relação ao rendimento total. ....	88
Figura 4.28 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para o rendimento total. ....	89
Figura 4.29 - Superfícies resposta da influência da concentração de ART e tempo de residência no Rendimento total do sistema fermentativo. ....	90
Figura 4.30 - Superfícies resposta da influência da concentração de ART e vazão de reciclo no Rendimento total do sistema fermentativo. ....	90
Figura 4.31 - Superfícies resposta da influência da vazão de reciclo e tempo de residência no Rendimento total do sistema fermentativo. ....	91
Figura 4.32 - Distribuição de resíduos relativos à produtividade total. ....	93
Figura 4.33 - Valores preditos em relação aos observados da produtividade total. ....	94
Figura 4.34 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a produtividade total. ....	94
Figura 4.35 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e vazão de reciclo de células na produtividade total do sistema fermentativo. ....	95
Figura 4.36 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e tempo de residência na produtividade total do sistema fermentativo. ....	96
Figura 4.37 – Superfícies resposta de resposta da influência do tempo de residência e vazão de reciclo de células na produtividade total do sistema fermentativo. ....	96
Figura 4.38 - Distribuição de resíduos relativos ao açúcar residual total. ....	99
Figura 4.39 - Valores preditos em relação aos observados ao açúcar residual total. ....	99
Figura 4.40 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para o açúcar residual total. ....	100
Figura 4.41 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e vazão de reciclo de células na concentração do açúcar residual do sistema fermentativo. ....	100
Figura 4.42 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e tempo de residência na concentração do açúcar residual do sistema fermentativo. ....	101
Figura 4.43 – Superfícies resposta de resposta da influência do tempo de residência e vazão de reciclo de células na concentração do açúcar residual do sistema fermentativo. ....	101
Figura 4.44 – Curvas de contorno para Concentração de sacarose na alimentação, vazão de reciclo de célula e tempo de residência. ( — produtividade (g/L.h); — açúcar residual (g/L); --- rendimento (%)). (a) Fixando S0 em 225 g/L; (b) Fixando TR em 6h; (c) Fixando V em 5 mL/s. ....	103
Figura 4.45 – Distribuição cumulativa de F(t). Ensaio com meio e biomassa no Sistema 1. ....	106
Figura 4.46 – Distribuição cumulativa de F(t). Ensaio com meio e biomassa no Sistema 2. ....	106

Figura 4.47 - Fermentação alcoólica com leveduras floculantes C2/00 em diferentes concentrações de melaço.....	108
--	-----

---

## LISTA DE TABELA

---

Tabela 3.1 –Composição do meio de cultura para realização do plaqueamento. ....	33
Tabela 3.2- Limites das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas isoladas. ....	35
Tabela 3.3 - Valores utilizados no planejamento para as três variáveis independentes.....	44
Tabela 3.4 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis. ....	45
Tabela 4.1 – Parâmetros cinéticos obtidos para cada cepa: $Y_{p/S}$ (g <sub>cel</sub> /g <sub>sac</sub> ), $Y_{x/S}$ (g <sub>cel</sub> /g <sub>sac</sub> ), PROD (g <sub>cel</sub> /L.h), VCS (g <sub>sac</sub> /L.h), NCO (%). ....	51
Tabela 4.2 – Resultados da influência do pH no rendimento e produtividade na fermentação alcoólica para uma concentração inicial de ART de 189,5 g/L e tempo de fermentação 24 horas, experimentos realizados em <i>shaker</i> a 32°C.....	56
Tabela 4.3 - Resultados da influência da temperatura empregando a cepa C2/00, para uma concentração inicial de 168,42 g/L de ART, a pH 4,5, em 10 h de fermentação.....	58
Tabela 4.4 - Resultados da influência da agitação na fermentação alcoólica em <i>shaker</i> a pH 4,5 e concentração inicial 168,42 g/L de ART, a 32°C durante 15 h.....	59
Tabela 4.5 - Velocidade específica de sedimentação em diferentes valores de pH para a cepa da levedura C2/00.....	61
Tabela 4.6 – Resultados da influencia do uso de antibióticos na fermentação alcoólica com células floculantes em reação batelada. ....	73
Tabela 4.7 – Resultados de açúcar redutor, concentração celular, concentração de etanol e glicerol (g/L), obtidos através dos experimentos com tempo de residência de 17 horas.....	76
Tabela 4.8 – Resultados de açúcar redutor, concentração celular, concentração de etanol e glicerol (g/L), obtidos através dos experimentos com tempo de residência de 12 horas.....	77
Tabela 4.9 – Rendimento e produtividade para as diferentes vazões de reciclo estudadas. ....	82
Tabela 4.10 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da concentração de sacarose na alimentação, vazão de reciclo de célula e tempo de residência.....	84
Tabela 4.11 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de rendimento total da fermentação no sistema de reatores.....	86
Tabela 4.12 – ANOVA para a resposta de rendimento total. ....	87
Tabela 4.13 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de produtividade total da fermentação no sistema de reatores.....	92
Tabela 4.14 – ANOVA para a resposta de produtividade total. ....	93

Tabela 4.15 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de açúcar residual total (ART) da fermentação no sistema de reatores. ....	97
Tabela 4.16 – ANOVA para a resposta de açúcar residual.....	98
Tabela 4.17- Rendimento, produtividade e sacarose residual da fermentação alcoólica para diferentes concentrações de melaço para a levedura C2/00.....	108

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$S_0$  - concentração de sacarose na alimentação (g/L)  
 $V$  – vazão de reciclo ( $m^3/s$ )  
 $TR$  – tempo de residência (h)  
 $ART$  – açúcar redutores totais (g/L);  
 $\mu$  - velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ );  
 $\mu_{\max}$ - velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ );  
 $S$  - concentração do substrato limitante (g/L);  
 $K_S$ - constante de Monod, (g/L), que depende do micro-organismo e das condições de cultura;  
UFC – unidades formadoras de colônias (UFC);  
VCS = Velocidade de consumo de sacarose (g/L.h);  
SAC= Massa de sacarose consumida (g);  
 $V_m$ = Volume de meio (L);  
 $Y_{x/s}$  = Rendimento celular (g<sub>células</sub>/g<sub>substrato</sub>);  
 $MX$  = Massa celular produzida (g);  
 $MS$  = Massa de sacarose consumida (g);  
NCO = Nível de Conversão de ART (%);  
 $SAC_i$ = Massa de sacarose inicial (g);  
 $SAC_f$ = Massa de sacarose final (g);  
 $\phi$ = Produtividade (g/L,h);  
ETOH= Massa de etanol (g);  
 $V_m$ = Volume de meio (L);  
 $t_f$ = Tempo de fermentação (h);  
 $Y_{p/s}$  = Rendimento de produto (etanol) (g de etanol/g de substrato);  
ETOH= Massa de etanol (g);  
SAC = Massa de sacarose consumida (g);  
VES = velocidade específica de sedimentação;  
Abs = absorbância;  
 $t$  = tempo (min);  
 $F(t)$  – função resposta F  
 $\lambda_1$  – Condutividade elétrica na saída do reator em cada instante.  
 $\lambda_0$  – Condutividade elétrica na saída do reator no tempo inicial.  
 $\lambda_\infty$  – Condutividade elétrica na saída do reator no tempo final.  
 $\tau_{teo}$  – tempo de residência teórico;  
 $V_R$  – Volume do reator e tubulações ( $L^3$ )  
 $v$  – vazão utilizada ( $L^3 \cdot t^{-1}$ )  
 $\sigma_\theta$ = variância adimensionalizada;  
 $Pe$ = número de Peclet;  
 $\tau$  = tempo de residência médio.

---

## RESUMO

---

A produção de bioetanol é uma alternativa interessante para a substituição dos combustíveis à base de petróleo. Com intuito de diminuir os custos desta produção, estudos são impulsionados na direção de encontrar leveduras e processos alternativos que alcancem altos rendimentos e produtividades para a fermentação alcoólica. O uso de leveduras floculantes se mostra interessante por facilitar a separação e, consequentemente, a reutilização de células pelo processo de decantação. No presente trabalho, estudou-se o uso de *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes em processo contínuo com dois reatores torre em série com decantadores intermediários e recirculação celular. Os testes utilizaram meio sintético e as análises de etanol e açúcares foram feitas por cromatografia líquida. Foram analisadas seis cepas floculantes pelo estudo da capacidade fermentativa, que resultou na escolha da cepa C2/00 *Saccharomyces cerevisiae*, doada pelo CPQBA. Após a escolha da cepa foram analisadas a influência da temperatura, pH e agitação na floculação e no rendimento da fermentação alcóolica, sendo verificado que os melhores resultados foram obtidos a 32°C, pH 4,5 a 5,0 e 150 rpm de agitação. A velocidade de sedimentação da levedura floculante foi influenciada pelo pH, obtendo a maior velocidade de sedimentação específica, 0,240 min<sup>-1</sup> a pH 5,0 e para valores de pH em torno de 4,0 foi obtido 0,178 min<sup>-1</sup>. Estes valores de velocidade de decantação permitem uma boa separação dos flocos do meio sobrenadante nos decantadores durante o processo fermentativo, facilitando a recirculação de células. Verificou-se a eficiência do uso de antibióticos naturais e comerciais no controle da contaminação microbiana da fermentação e obteve-se resultados satisfatórios com o emprego de Kamoran a 6ppm, Beta Bio a 35 ppm e 50 ppm de ácido nalidíxico e ampicilina. Estudou-se várias condições de processo para se chegar ao sistema de dois fermentadores tipo torre ligados em série com decantadores intermediários, que promoveram a recirculação de células garantindo o funcionamento no processo contínuo e obtendo altos valores de rendimento e produtividade. Foi realizado um Planejamento Composto Central com intuito de analisar a influência simultânea da concentração de sacarose na alimentação ( $S_0$ ), vazão de reciclo para o primeiro reator (V) e tempo de residência total (TR), sendo que os melhores resultados foram obtidos no ponto central ( $S_0 = 225$  g/L; V = 5 mL/s e TR = 6h), os quais foram: rendimento de 92,4%, produtividade de 17,37 g/L.h e 16,03 g/L de açúcar residual. Após os estudos utilizando meio sintético, realizou-se experimentos com meios industriais (caldo-de-cana), para verificar o funcionamento e eficiência do sistema de reatores em estudo e obteve-se um rendimento de 93,8%, resultado este promissor quando comparado aos valores obtidos industrialmente.

Palavras-chave: bioetanol, fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae* floculante, reatores torre em série.

---

## ABSTRACT

---

Bioethanol production is an interesting alternative for the replacement of petroleum-based fuels. In order to reduce the production costs, studies have been driven toward finding alternative strains and processes that achieve high yields and productivities for alcoholic fermentation. The use of flocculant yeast is interesting because it shows facilitate separation and thus reusing cells by decantation process. In the present work the use of a flocculant *Saccharomyces cerevisiae* strain in continuous process was studied employing two tower reactors in series. In the experiments synthetic medium was used and the ethanol and sugar analyzes were done by liquid chromatography. Six flocculant yeast strains were evaluated for their fermentative capacity, which resulted in the choice of the strain C2/00, donated by CPQBA. After choosing the strain, the influence of temperature, pH and agitation rate on flocculation and fermentation yield were analyzed, and the best results were obtained at 32°C, pH 4.5 to 5.0 and 150 rpm. The sedimentation velocity of flocculant yeast was influenced by pH, obtaining the highest sedimentation specific velocity,  $0.240 \text{ min}^{-1}$  at pH 5.0 and at pH 4.0 was obtained  $0.178 \text{ min}^{-1}$ . These velocities values allowed a good separation of flakes in the supernatant medium during the fermentation process, facilitating the cells recirculation. It was studied the effectiveness of using natural and commercial antibiotics to control contamination of fermentation and obtained satisfactory results with the use of the Kamoran 6 ppm, Beta Bio 35 ppm and 50 ppm for nalidixic acid and ampicillin. It was analyzed several process conditions until reaching the configuration of two tower reactors connected in series with decanters for effluents of both reactors and cell recirculation to the respective reactor. This system was operated satisfactorily and the recirculation of cells ensured a better mixture in the reactor, reaching high yields and high productivities. A Central Composite Design (CCD) was applied to study the simultaneous influence of sucrose concentration in the system feed ( $S_0$ ), recycle flow rate for reactor first (V) and total residence time (TR). The best results were obtained at the central point ( $S_0 = 225 \text{ g/L}$ ,  $V = 5 \text{ mL/s}$  and  $TR = 6 \text{ h}$ ), which were yield 92.4%, productivity of  $17.37 \text{ g/L.h}$  and  $16.03 \text{ g/L}$  residual sugar. After studies using synthetic medium, experiments were realized with sugar cane juice as sugar source in the reactor system under study and it was obtained a yield of 93.8%.

Keywords : bioethanol fermentation , flocculant *Saccharomyces cerevisiae*, tower reactors in series

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCÃO

---

Os combustíveis derivados de petróleo representam em torno de 46% do consumo mundial de energia, enquanto no Brasil este percentual cai para 37,6%, porém como combustíveis fósseis, suas reservas são finitas e seu uso é uma fonte importante de emissão de gases de efeito estufa. Encontrar substitutos para estes combustíveis a partir de matérias orgânicas renováveis tem sido um grande objetivo da comunidade científica mundial. Uma das opções é o etanol, um excelente substituto para a gasolina, o principal combustível usado em automóveis no mundo (LAUTENSCHLAGER, 2013).

No Brasil, o etanol produzido a partir da cana de açúcar substitui, atualmente, cerca de 50% da gasolina que seria consumida, e seu custo é competitivo sem os subsídios que viabilizaram a criação do Proálcool em meados da década de 1970. Segundo dados da Secretaria de Energia do Estado de São Paulo, em 2010, a participação de energias renováveis na matriz energética mundial era de apenas 12,5%, enquanto que na brasileira era de 45,5%. No Estado de São Paulo este percentual sobe para 55,5%, sendo que a energia dos derivados da cana de açúcar, etanol e bagaço, representa 35,5% do total, contra 17,8% para o restante do País. Esta participação da cana de açúcar na matriz energética brasileira provém de uma área cultivada da ordem de 4,2 milhões de hectares, o que representa em torno de 0,5% da área agricultável do País (LAUTENSCHLAGER, 2013).

A produção brasileira de bioetanol tem crescido substancialmente, numa taxa de crescimento muito acima da expansão da área agrícola empregada para a cultura da cana. Este fato se deve aos avanços tecnológicos alcançados, tanto na área agrícola, como na área industrial. Nesta, os processos de fermentação alcoólica evoluíram a partir dos sistemas em batelada com separação de fermento do vinho dos anos 1930, aos processos batelada alimentada e contínuos empregando centrífugas eficientes, com recirculação e tratamento de fermento. Este fato foi um grande avanço no setor, que aliado à seleção de leveduras de alta capacidade fermentativa, melhorias constantes nos processos produtivos, aumento da eficiência energética do setor, avanços nos processos de destilação, autonomia nacional na produção de equipamentos e insumos, fez com que a indústria brasileira do etanol de primeira geração, utilizando cana de açúcar como matéria prima, seja uma das mais competitivas e mais modernas do mundo (LAUTENSCHLAGER, 2013).

O emprego do etanol como combustível veicular no Brasil tem sido cíclico, com as primeiras citações do seu uso na década de 1920, e em mistura com a gasolina em 1931, sempre associado a grandes aumentos nos preços mundiais do petróleo. Na década de 1970 surgiu um marco interessante, que foi a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). A partir do Proálcool houve grande aumento na produção brasileira de etanol, destinado à frota de automóveis movidos com álcool hidratado, porém em 1986 começou uma fase de desaceleração do programa e uma vertiginosa diminuição da produção de veículos movidos a álcool. Iniciou-se então uma fase de aumento crescente da produção do combustível na forma anidra, para uso em mistura à gasolina. Na safra 2000/2001, a produção do etanol anidro já superava à do hidratado, safra na qual a produção de etanol total foi bastante reduzida em relação aos anos anteriores. Em 2003 surgem os veículos *flex-fuel* no Brasil e inicia nova fase na história do bioetanol brasileiro, atingindo nos dias de hoje mais de 90% da produção brasileira de veículos leves com ciclo Otto, que podem utilizar gasolina ou etanol hidratado(ROSA, 2005; XU et al., 2005).

Hoje tem-se no Brasil uma frota expressiva de automóveis *flex-fuel* que tem impulsionado a produção de etanol para combustível veicular, porém os preços de venda da gasolina no País são mais favoráveis aos consumidores e os elevados preços do açúcar a nível internacional tem diminuído o interesse dos empresários nacionais em produzir o referido biocombustível. Assim, melhorias de processos produtivos do etanol de primeira geração, com possíveis reflexos em diminuição de seu custo tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto no campo, como na indústria. Além disso, as pesquisas em produção de etanol de segunda geração, a partir de matérias primas lignocelulósicas, tais como bagaço de cana tem despertado grande interesse por parte de pesquisadores.

Os processos de fermentação alcoólica têm sido conduzidos pelo uso de diferentes cepas selecionadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na sua grande maioria, empregando células dispersas no meio de fermentação. Uma linha de pesquisa seguida por diferentes pesquisadores tem sido o emprego de processos com alta densidade celular, via imobilização ou flocação (auto imobilização), no qual se consegue uma alta população celular por unidade de volume do reator. A tecnologia de flocação espontânea de células aumenta a concentração celular pela retenção dos flocos no interior do reator sem o uso de um suporte inerte, se mostra economicamente competitiva e representa um novo conceito de imobilização (GE et al., 2006). A habilidade de flocular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido considerada na produção de etanol um sistema auto-imobilizado (ANDRIETTA et al., 2008).

A floculação indesejada é aquela encontrada em fermentações industriais utilizando leveduras livres e contaminadas com bactérias e também com leveduras selvagens, fato este de grande repercussão negativa no desempenho das centrífugas separadoras de fermento e no rendimento do processo. Já o emprego de leveduras floculantes se iniciaram no Brasil a partir de 1980, com o principal objetivo de substituir as centrífugas por decantadores, operações mais baratas e de manutenção mais simples.

Estes fatos contribuíram para que ocorresse a instalação de um pequeno número de unidades industriais empregando tal tecnologia, atualmente três em funcionamento no Brasil, todas empregando reatores de mistura em processo contínuo, com decantadores e cubas de tratamento ácido. Ao final dos anos 1990, este interesse é retomado por pesquisadores da área de fermentação alcoólica industrial do Brasil. A seleção de diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tem sido realizada por diferentes pesquisadores e o emprego de reatores tipo tubulares de escoamento contínuo, denominados reatores torre, têm sido muito estudados a nível de experimentos de bancada e piloto.

Com base no exposto, o presente trabalho apresentou como objetivo geral estudar o processo de fermentação alcoólica empregando uma cepa selecionada de *Saccharomyces cerevisiae* com características floculantes, em um sistema de dois reatores torre com escoamento ascendente, operado continuamente.

Como objetivos específicos podem ser citados:

- Avaliar a capacidade fermentativa de seis cepas de características floculantes dadas por órgãos de pesquisa em bioetanol;
- Com base nos resultados de capacidade fermentativa, escolher a cepa com os parâmetros de processo mais adequados para continuidade do estudo;
- Estudar a influência do pH, da temperatura e da taxa de agitação na floculação e desfloculação da cepa e no rendimento e na produtividade;
- Estudar a velocidade de sedimentação e a influência do pH nesta velocidade;
- Estudar o controle da contaminação utilizando antibióticos comerciais e naturais;
- Desenvolver o sistema experimental de reatores, decantadores e correntes de reciclo para realização dos experimentos;
- Estudar, aplicando a técnica estatística de um planejamento experimental, a influência da concentração de sacarose na alimentação do sistema de reatores,

a vazão de reciclo do decantador para o primeiro reator e o tempo de residência total do sistema no desempenho global do processo.

---

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Neste capítulo será apresentada e discutida a revisão bibliográfica sobre o tema de fermentação alcoólica, com ênfase nos processos fermentativos utilizando leveduras de características floculantes em sistemas contínuos com reatores torres em série.

#### **2.1 Biocombustível**

A consciência da importância e de todos os problemas pertinentes à questão do petróleo em nível mundial o têm tornado um dos temas nevrálgicos no mundo contemporâneo e, aliado à discussão sobre o tema, pesquisas que buscam por um produto similar, com menor impacto ambiental, têm sido alvo de muitos laboratórios no Brasil.

Aflutuação dos preços dos combustíveis à base de petróleo no mundo, provocada pela instabilidade geopolítica dos países que controlam a maior parte das reservas de petróleo, e o clima brasileiro, impulsionam pesquisas por fontes de energia alternativas. Por isso existe o desenvolvimento de pesquisas em biocombustível para substituição do petróleo desde 1970(OBERLING et al., 2012). Além disso, outro fator, tão ou mais preocupante que os demais, também impulsiona estas novas pesquisas: a poluição causada pelo uso do petróleo como combustível. Os biocombustíveis por se tratar de combustíveis oriundos de fontes renováveis, contribuem para redução da emissão de poluentes, já que a grande parte dos poluentes resultantes da queima é reabsorvida nos ciclos de crescimento das plantas (NOGUEIRA e CAPAZ, 2013; DIAS et al., 2013).

Quanto a essas novas fontes de energia, as mesmas já vêm sendo bastante utilizadas, pois como é sabido, o setor de transporte no Brasil, é abastecido com combustível de origem fóssil e biocombustível líquido. Já o etanol produzido a partir da cana de açúcar, milho ou outros cereais e o biodiesel, no qual o etanol é utilizado no ciclo de sua produção, representam aproximadamente 2,4% do combustível consumido neste setor (ATALA, 2004).

Também vale lembrar que o Brasil é um país no qual aproximadamente metade da energia total utilizada é suplementada por fontes renováveis, principalmente pelas usinas hidrelétricas, cana-de-açúcar e madeira. E no que se refere à cana, em específico, em 2011

aenergia oriunda da cana-de-açúcar foi muito importante na matriz total, pois representou 15,7% da oferta nacional de energia (EPE, 2012).

Contudo, a expansão do mercado mundial de biocombustível preocupa quanto à sua sustentabilidade efetiva, pois intrinsecamente relacionada a ela está a questão da segurança alimentar e agrícola, a monocultura, desmatamento, esgotamento de recursos hídricos e condições de trabalho. Consequentemente, vários estudos buscam justificativas para o uso dos combustíveis de fontes renováveis (SOLOMON et al., 2007; KODAMA et al., 2013), como o etanol, assunto que será abordado a seguir.

### **2.1.1 Etanol**

Dentre os vários combustíveis de fonte renovável existentes, tem-se o etanol, que é considerado um combustível ecológico, uma vez que ele é obtido a partir de fontes renováveis cuja fonte principal, no Brasil, é a cana-de-açúcar. Também é ecológico porque contribui para a redução de CO<sub>2</sub> na atmosfera através da *fotossíntese* realizada pela fonte vegetal (COSTA e SODRÉ, 2010).

Além desse benefício, há de se considerar, por outro lado, que a utilização da cana-de-açúcar como matéria prima para a produção de etanol faz com que o custo por litro seja menor do que o produzido por outras biomassas, como, por exemplo, a partir do milho e trigo, pois não é necessária a conversão de amido em glicose, o que ocorre nos processos que utilizam milho e trigo nos Estados Unidos e Alemanha, respectivamente (ANDRIETTA et al., 2006; FURTADO e SCANDIFFIO, 2006). Sendo assim, pode-se dizer que o país que tiver uma maior produção de cana-de-açúcar estará numa posição privilegiada no que concerne a esse tipo de energia renovável.

Coincidente e afortunadamente, o Brasil tem sido um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo. Em 1961, por exemplo, foi responsável por 85% da produção de cana-de-açúcar dos países do MERCOSUL, o que aumentou para 97% nos anos 2007/2008 devido aos avanços tecnológicos relacionados à utilização de álcool como combustível (COSTA, JUNIOR e ARANDA, 2010; COSTA e SODRÉ, 2011). Em 2009 era também o maior produtor de etanol à base de cana-de-açúcar, com área de 8,7 milhões de hectares (IBGE, 2009). Ou seja, tem-se matéria-prima em abundância, o que, consequentemente, possibilita uma produção significativa.

Quanto a esta produção, no Brasil, são produzidos dois tipos de etanol para aplicação automotiva: o etanol anidro e o hidratado. O etanol anidro contém no máximo 0,7% de água em relação ao peso e o hidratado constituído de 7,4% de água em relação ao peso medido a 20°C (ABNT, 1978). A preocupação ambiental favoreceu a utilização do etanol anidro como aditivo antidetonante na gasolina e as concentrações na mistura variam de 20 a 25% (p/p), no lugar do chumbo tetraetílico e hidrocarbonetos aromáticos (DUARTE, 2011). Já o etanol hidratado é usado como combustível alternativo em veículos comerciais leves. E no que se refere à melhoria do desempenho do motor desses veículos, a mesma pode ser obtida de diversos meios, tais como aumento da taxa de compressão, pois esta aumenta a densidade da mistura ar-combustível, resultando em cilindros de alta pressão e velocidade de queima rápida. A razão de compressão do motor *flex* está limitada pela resistência à detonação da gasolina que é menor do que o valor ótimo para a operação em etanol (COSTA e SODRÉ, 2011).

Dada a alta procura por esses tipos de etanol, tanto do mercado interno quanto externo, em 1975 foi criado o Proálcool com objetivo de atender a esses mercados. Durante a existência do Proálcool, pode-se detectar cinco fases distintas, a saber (COSTA, JUNIOR e ARANDA, 2010).

A primeira (1975-1979) foi caracterizada por um grande esforço de produção de álcool anidro a partir do melaço para se adicionar à gasolina. Na segunda fase houve um novo aumento do preço do barril de petróleo. Neste período a produção de etanol atingiu 15% a mais que a meta estabelecida. (COSTA, JUNIOR e ARANDA, 2010). Em 1986, 96% da quota do mercado era de veículos utilizando etanol como combustível (COSTA e SODRÉ, 2011). A terceira fase conhecida como período de estagnação durou de 1986 a 1995. Com a queda do preço do petróleo houve o comprometimento do desenvolvimento de combustíveis alternativos. A quarta fase de 1995 a 2000, o governo reconsiderou o Proálcool, mas as usinas estavam voltando sua produção para o açúcar e a produção industrial de automóveis à base de álcool diminuiu acentuadamente (KARAN, 2006). Na quinta e atual fase surgiu a tecnologia de carros *flexfuel* (motores de combustível, que podem operar com misturas de etanol e gasolina em qualquer concentração). Consequentemente, isto impulsionou uma nova fase de expansão da produção de cana-de-açúcar no país com o objetivo de oferecer o combustível em larga escala (COSTA, JUNIOR e ARANDA, 2010, COSTA e SODRÉ, 2011).

Atualmente, o incentivo à produção de etanol em substituição aos combustíveis fósseis tem sido bem diferente daquele momento do Proálcool, pois hoje tal incentivo visa à obtenção do reconhecimento da tecnologia envolvida para esse fim, a utilização de um

combustível limpo, proveniente de uma fonte renovável, a preocupação com a qualidade do ar e a redução da emissão de CO<sub>2</sub> (LIU et al., 2009). Além disso, o estudo da fermentação alcoólica é incentivado na busca de tecnologia que visa ao aumento da produtividade, à redução dos custos, escolha de micro-organismos, à escolha de matérias-primas e de biorreatores para obter melhor eficiência energética (LIU et al., 2009; DUARTE, 2011).

No que tange ao aumento da produtividade, em especial, o etanol de segunda geração, a partir da lignocelulose, como bagaço de cana, é uma das alternativas para aumentar a produção do etanol, mas ainda é oneroso, pois a bioconversão de lignocelulose em etanol envolve numerosos processos (KODAMA et al., 2013; ALKASRAWI et al., 2013). A integração do processo de produção de etanol de primeira e segunda geração a partir da cana pode melhorar sua viabilidade (DIAS et al., 2013), pois o processo integrado vai exigir um menor investimento, uma vez que algumas operações poderão ser compartilhadas entre ambas as plantas (DIAS et al., 2009). Além disso, inibidores da fermentação gerados durante o pré-tratamento terão efeitos menores sobre o rendimento do licor hidrolisado que será misturado ao caldo de cana (DIAS et al., 2012).

A partir desse contexto, portanto, pode-se ter uma ideia do quanto às pesquisas nesta área ainda são de suma relevância e do longo caminho ainda a percorrer em busca de uma energia renovável que seja sustentável, não onerosa e que possa atender ao mercado interno e externo entre outras necessidades exigidas pelo mundo contemporâneo. Como a energia renovável que interessa a esta pesquisa, a seguir, falar-se-á sobre formas de condução da fermentação alcoólica, visto que a mesma é um caminho, bastante estudado, que culmina no etanol.

## 2.2 Formas de condução da fermentação alcoólica

Ainda no âmbito das pesquisas, mas sob outro viés, mas com o mesmo fim, o etanol, tem-se o tema da fermentação alcoólica. Ela tem sido muito estudada nas últimas décadas e, nos últimos 30 anos, os resultados dessas pesquisas têm revelado que os rendimentos fermentativos obtidos têm alcançado valores muito altos, na ordem de 91% em relação ao teórico, e que pouco se tem a ganhar com melhorias neste sentido.

Contudo, no Brasil, a maioria dos processos fermentativos são bateladas alimentadas e no que se refere a melhorias, ela pode existir, mas apenas no modo de operação, por isso alguns arranjos de reatores e novidades operacionais estão sendo investigadas.

Ainda em relação à fermentação alcoólica, de uma maneira geral, ocorre em um meio de cultura preparado para que o micro-organismo se adapte bem, nutra e se desenvolva para o acúmulo do produto desejado, o etanol. A fermentação ocorre no interior do biorreator, onde é adicionado o meio de cultura e os micro-organismos que deverão permanecer no reator até que o processo ocorra.

Os reatores da fermentação, também denominados de dornas, geralmente são construídos de aço, tem forma cilíndrica, com altura igual a uma vez e meia ou, duas vezes, o seu diâmetro em média (LIMA et al., 2002). Normalmente são fechados e mantidos com a temperatura de 32 a 35°C até o final do processo, quando a concentração de etanol se situa entre 7 a 12°GL. Um sistema de lavador de gases é acoplado aos biorreatores para a recuperação do etanol evaporado, que gira em torno de 1,5% do etanol gerado. A fermentação geralmente inicia com uma concentração celular de  $10^6$  a  $10^7$  células/mL e ao final pode atingir valores de  $10^8$  células/mL (DUARTE, LOURENÇO e RIVEIRO, 2006; PACHECO, 2010). A metodologia, o volume, a disposição dos reatores, a necessidade ou não de reciclo dos micro-organismos e a forma de alimentação do processo são bem variados, resultando em diversas formas de condução da fermentação alcoólica (LIMA, 1992). Os processos fermentativos na produção de etanol podem ser predominantemente, batelada, batelada alimentada e contínuo e serão apresentados e brevemente discutidos a seguir.

### **2.2.1 Processos descontínuos – Bateladas**

Os processos descontínuos são conhecidos como bateladas. Nestes processos, o meio fermentativo, conhecido como mosto, é inoculado com os micro-organismos na dorna de fermentação onde as condições ótimas para o agente da fermentação são mantidas. Após o tempo de fermentação a dorna é descarregada, o meio fermentado passa para os tratamentos finais e as dornas passam por um processo de limpeza e desinfecção da mesma para dar início a um novo processo (CARVALHO e SATO, 2001; SCHIMIDELL e FACCIOOTTI, 2001). O processo batelada apresenta algumas vantagens, se comparado ao contínuo, como: menor risco de contaminação e grande flexibilidade de operação. Porém, tem suas desvantagens, pois a fermentação batelada apresenta vários “tempos mortos”. Tempos estes que não são utilizados para a fermentação, como o tempo de carga e descarga e o tempo de lavagem da mesma (CARVALHO e SATO, 2001). Devido à baixa produtividade ao longo do processo, estimula o surgimento de formas alternativas de condução das fermentações, com intuito de diminuir

esses tempos não produtivos. A condução da fermentação alcoólica em batelada é muito útil em pesquisas de laboratório e também em processos de aguardentes e na produção de bebidas alcoólicas (PACHECO, 2010).

Ainda no que concerne ao processo batelada, estudiosos como Choi et al. (2010), utilizaram a fermentação batelada em mosto de hidrolisado de mandioca com uma levedura híbrida (CHFY0321) de *Saccharomyces cerevisiae* não floculante e *Saccharomyces bayanus* de características floculantes, essa levedura híbrida alcançou uma produtividade de etanol de  $1,38 \pm 0,13$  g/L.h e um rendimento de  $94,2 \pm 1,58\%$ , à temperatura de  $32^{\circ}\text{C}$  e pH 4,5. Essa levedura se mostrou interessante para melhorar os processos fermentativos biotecnológicos, já que exibiu características de fermentação da *Saccharomyces cerevisiae* e a capacidade de floculação da *Saccharomyces bayanus*.

Já Galanakis et al. (2012), utilizaram fermentação batelada com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em pelletes de  $\gamma$ -alumina para estudar a influência da temperatura e da pressão na fermentação alcoólica. Feito isso, observaram que um aumento de pressão de 3 a 7 atm e uma diminuição de temperatura de 30 a  $20^{\circ}\text{C}$  reduziu a produtividade de cerca de 50 e 70%, respectivamente.

Duarte (2011), por sua vez, imobilizou *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de alginato de cálcio revestida ou não de quitosana em processo batelada. As revestidas em quitosana permitiram o reuso por oito ciclos de dez horas cada e atingiu um rendimento de 60,7%. Já com a imobilização apenas em alginato de cálcio obteve um rendimento de 64,6% utilizando glicose como fonte de carbono.

### **2.2.2 Processo em batelada alimentada**

O processo em batelada alimentada com recirculação de leveduras é largamente empregado no Brasil. É uma evolução do processo desenvolvido na década de 30, do século passado, pelo engenheiro Boinot nas Usinas de Melle, na França. Esse processo surgiu com o intuito de aumentar a produtividade do processo batelada que é baixa. Ela permite o controle e a adição de um ou mais nutrientes ao fermentador durante o processo de cultivo (CARVALHO e SATO, 2001b), o que diminui a inibição pelo substrato. Este processo apresenta menores riscos de contaminação e flexibilidade de operação quando comparado ao processo contínuo, permitindo a utilização de biorreatores para a fabricação de diferentes produtos (VIEGAS, 2003).

Almeida (1960) descreve algumas vantagens do sistema de batelada alimentada como, por exemplo, a economia do açúcar devido à menor reprodução celular, levando a um alto rendimento em etanol; eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho e tratamento do leite de levedura e eliminação da necessidade de cultura pura na preparação do pé-de-cuba. Ainda nesse sentido, para Mcneil e Harvey (1990), nos processos de batelada alimentada com alta densidade celular, a produtividade é alta devido à grande quantidade de células viáveis no meio de fermentação. Além disso, é possível o controle da quantidade de açúcar, minimizando o efeito da inibição do substrato e permitindo a adição nos momentos mais propícios da fermentação, levando ao acúmulo de produtos específicos.

Nos estudos de Frohman e Orduña (2013), os pesquisadores compararam a fermentação alcoólica tradicional com a batelada alimentada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e mantendo altas concentrações de açúcar no suco de uva para analisar o efeito do estresse osmótico nas duas operações. Neste estudo, constatou-se que as concentrações finais de etanol foram semelhantes, mas a produtividade foi superior no semicontínuo e as concentrações dos subprodutos como glicerol, ácido acético e acetaldeído foram menores também na batelada alimentada.

Já Chang et al. (2012) acreditaram que no processo batelada alimentada poderia obter uma alta produtividade da fermentação alcoólica utilizando uma concentração de glicose elevada. Sendo assim, propuseram um trabalho no qual utilizaram a operação aeróbia no início do processo de batelada alimentada para aumentar a formação de biomassa e depois utilizaram o anaeróbio para acelerar a produção de etanol na fase posterior. Os melhores resultados foram obtidos em uma baixa concentração de glicose na fase aeróbia inicial, depois mantendo uma concentração alta de glicose na fase anaeróbia. Próximo do fim da operação de batelada alimentada, foi interessante aumentar ainda mais a concentração de glicose. Com esse processo foi possível o aumento da produtividade de etanol na fermentação em batelada posteriormente (CHANG et al., 2012).

### **2.2.3Processo contínuo**

De uma forma geral, neste tipo de processo (processo contínuo) não há interrupções ao longo do processo, visto que ocorre a retirada contínua do produto a uma vazão igual à da alimentação, permitindo um fluxo contínuo, reduzindo, assim, o efeito inibitório do etanol e do substrato.

O início de uso industrial da fermentação contínua foi na década de 40, em países como França e Estados Unidos. Porém só foi estimulado após a década de 70, com a crise do petróleo. As primeiras instalações surgiram de adaptações no sistema batelada, através de ligações entre as dornas existentes. O mosto passava pela série de dornas. A alimentação de mosto era feita na primeira ou na primeira e segunda dorna e o mosto fermentado na última dorna era recolhido em uma “dorna de espera” onde a redução dos açúcares era concluída (AMORIN, 2005).

No Brasil, os primeiros sistemas contínuos surgiram em 1965, e foram intensificados, posteriormente, com o Proálcool. Segundo esta fonte, o primeiro sistema contínuo foi instalado em 1990, na Açúcar Guarani, porém, relata-se que em 1979, um processo trazido da França foi instalado na Usina Santa Adelaide, no município de Dois Córregos-SP (AMORIN, 2005).

A fermentação contínua normalmente tem seu início em um processo descontínuo, pois se carrega inicialmente o reator com o mosto e com o pé-de-cuba, que após um período de operação descontínua dá início à alimentação do mosto e à retirada do produto de forma contínua na mesma vazão (FACCIOTTI, 2001). O mosto é misturado ao fermento na primeira dorna e passará de forma contínua às demais dornas, sendo a concentração de açúcares reduzida aos poucos. A duração da fermentação é de oito a quatorze horas, resultando num vinho com 6 a 8% de álcool. O rendimento da fermentação varia de 82 a 91% em relação ao estequiométrico.

Como na fermentação contínua ocorre a retirada do produto sem interrupções na mesma vazão da alimentação, reduz assim o efeito inibitório do etanol e do substrato (WANG et al., 2013).

Segundo Andrietta (1994), a fermentação contínua apresenta algumas vantagens frente aos outros processos de produção de etanol, tais como:

- Aumenta a produtividade do processo frente à redução de tempos mortos ou não produtivos;
- O produto sairá de forma uniforme o que facilitará o projeto das operações de recuperação do produto de interesse;
- Possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção;
- Menor necessidade no emprego de mão de obra.

Contudo, como pontos negativos (FACCIOTTI, 2001) alguns autores comentam sobre a dificuldade de se manter o meio estéril por muito tempo e a ocorrência de mutantes não interessantes durante o processo, podendo resultar na seleção de um mutante menos produtivo; dificuldade de manutenção da homogeneidade do reator quando se trabalha com vazões baixas, devido à formação de espumas; crescimento microbiano nas paredes do reator ou nos sistemas de entrada e saída de produtos.

Independente dos aspectos negativos, alguns trabalhos científicos nessa área têm ocorrido, isto é, trabalhos que utilizaram o sistema contínuo para fermentação alcóolica. Nesse sentido, haja vista o trabalho de Vasconcelos (1998) que imobilizou *Saccharomyces cerevisiae* em colmos de cana-de-açúcar pela técnica de adsorção, por imersão do suporte em suspensão de células de concentração de  $10^8$  leveduras/mL. O sistema contínuo manteve atividade metabólica e rigidez por um período superior a uma safra sucroalcooleira e alcançou uma produtividade de 29,64 g<sub>etanol</sub>/L.h.

E ainda nessa linha de pesquisa, tem-se Wendhausem et al. (2001) que trabalharam com um fermentador contínuo e células imobilizadas, conseguindo um rendimento de etanol de 97,3%. Esse mesmo sistema conduzido com células livres garante um rendimento menor que 84,5%. Já Najafpour et al. (2004) estudaram a fermentação alcoólica contínua com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio, atingindo rendimento de até 83,53% em relação ao teórico com uma conversão máxima de sacarose de 92,68%. Wang et al. (2013), por sua vez, utilizaram um sistema contínuo para fermentação alcoólica com leveduras floculantes, utilizando dois reatores de mistura em série com recirculação de células. Esse sistema foi eficaz com altas taxas de recirculação celular com diferentes taxas de concentração de sacarose na alimentação.

E por fim, Kopsaheliset et al. (2013) estudaram a fermentação de melaço de açúcar de cana com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em farelo de grãos de cevada em um sistema contínuo comparando dois biorreatores em uma torre de leito fixo e uma torre de leito fixo em múltiplos estágios. O reator em múltiplos estágios alcançou melhores resultados em relação à concentração de etanol, produtividade e conversão. O sistema contínuo utilizando o reator de múltiplos estágios trabalhou continuamente durante trinta e um dias com melaço não esterilizado e não se observou contaminação, demonstrando com isso ter uma elevada estabilidade operacional.

### 2.3 Biorreatores

Biorreatores são reatores químicos nos quais ocorrem reações catalisadas por biocatalisadores, enzimas ou micro-organismos. Diversos tipos de biorreatores podem ser utilizados na fermentação alcoólica, mas a maioria das indústrias opta por reatores de mistura sem agitação mecânica, por ser um reator mais tradicional e simples. Muito embora seja o mais utilizado, os reatores de mistura apresentam um aspecto negativo, pois um problema detectado neste sistema é a decantação das leveduras na parte cônica dos reatores, diminuindo a produtividade pela falta de contato do micro-organismo com o substrato. Por isso, algumas inovações tecnológicas têm sido estudadas para melhorar o desempenho do processo fermentativo (PACHECO, 2010).

No campo dessas inovações tecnológicas, Zaperlone Andrietta (1992) descrevem a utilização de vários processos de fermentação contínua, dividindo-a em dois grupos: fermentação em dorna única e fermentação em cascata. Nesta as dornas são conectadas em série, nas quais o meio fermentativo passa consecutivamente de uma para outra; já naquela, todo o processo é realizado em dorna única e nela o teor de açúcar e álcool é constante.

Andrietta e Stupiello (1990) e Andrietta (1991), por outro lado, provaram em seus respectivos estudos que a produtividade da fermentação alcoólica que mede a velocidade de produção de álcool é maior quando se utiliza um sistema constituído de quatro reatores de mistura perfeita com volumes diferenciados ligados em série, passando de 1,084 g/L.h para 10,092 g/L.h.

O fato de a cinética da fermentação alcoólica sofrer forte inibição pelo produto, levou à constatação de que a remoção de etanol *in situ* parecia ser a melhor maneira de minimizar este efeito, aumentando a taxa de fermentação e produtividade. Neste contexto, entre muitas tecnologias disponíveis, a combinação de evaporação e remoção do etanol com fermentação tem sido amplamente investigada (ROFFLER et al., 1984; IKEGAMI et al., 2002; GROOT et al., 1992; ATALA, 2004).

Nagashima et al.(1984) contribuíram com essas inovações quando utilizaram dois tipos de arranjos de fermentação alcoólica contínua. O primeiro foi composto de dois reatores torre de leito fluidizado em série e no segundo arranjo utilizou três, todos com a relação diâmetro/altura diferentes. Ambos alcançaram uma alta produtividade cerca de vinte vezes as obtidas por métodos tradicionais, e o sistema se manteve estável por um longo período de tempo.

Mariano et al.(2010) otimizaram um inovador bioprocesso industrial, para a produção de biobutanol, empregando a tecnologia de fermentação contínua *flash*, em que o fermentador permanece na pressão atmosférica e o caldo é circulado a uma câmara de vácuo onde o butanol é continuamente fervido. Neste trabalho a técnica de superfície resposta foi usada para determinar as melhores faixas de condições de funcionamento para maximizar o rendimento e a produtividade do biobutanol. As faixas das condições ideais do processo foram de 130 a 180 g/L de sacarose inicial; tempo de residência de 3,5 a 5h; vazão para o *flash* entre 400 a 500 m<sup>3</sup>/h; vazão de purga de 25 m<sup>3</sup>/h e pressão no *flash* de 6,5kPa.

E no trabalho de Kopsahelis et al.(2013), eles estudaram a fermentação contínua do melaço em dois tipos de biorreatores de 30 cm de altura e 9 cm de diâmetro interno: o biorreator torre de leito fixo de múltiplo estágio (MFBT) e o biorreator de leito fixo (PB). O biorreator torre de leito fixo de múltiplo estágio (MFBT) consistiu em um cilindro de vidro contendo quatro compartimentos perfurados e recheados de 50g de biocatalisador imobilizado e o biorreator de leito fixo (PB) de mesmo tamanho contendo 200g de biocatalisador imobilizado. Ao longo da pesquisa, foram estudadas várias diluições de melaço no intuito de obterem melhores rendimentos.

Wang et al.(2013) utilizaram um sistema contínuo formado de dois tanques agitados de 5L de volumecada, onde o meio de cultivo esterilizado, cuja fonte de alimentação era sacarose era alimentado. Na saída dos reatores eram acoplados um decantador para reciclar as células de *Saccharomyces diastaticus* floculantes decantadas. Neste sistema foi estudado a influência da concentração do substrato na alimentação.

### **2.3.1 Reatores torres**

Os biorreatores torres são tubos cilíndricos preenchidos com células de micro-organismos, onde o meio a ser fermentado escoa através do leito do reator (Figura 2.1). Esses reatores possuem várias vantagens em relação a outras configurações como, por exemplo, a simplicidade do *design*, facilidade no controle operacional, altas taxas de reação com concentrações altas de células, facilidade de recuperação dos produtos, pouca necessidade de utilização de centrífugas para a separação de meio e células, escoamento tubular e fixação das partículas no leito (FERREIRA, 2003).



Figura 2.1 - Dois reatores torres (o autor).

Reatores torres de leito fixo têm sido amplamente utilizados em indústrias químicas, principalmente em reações catalíticas. Porém, atualmente, pesquisadores têm estudado a aplicação dos mesmos em processos biotecnológicos devido à facilidade operacional na qual o micro-organismo atua como agente de transformação. Vários autores utilizam esses biorreatores com células imobilizadas (TYAGI et al., 1992; GALASSI, 2007). A retenção das células nos reatores é uma opção para aumentar a taxa de diluição e de produtividade do etanol (WANG et al., 2013)

Paiva et al.(1996) demonstraram que é possível diminuir os custos de produção de etanol operando com um reator de forma contínua - do tipo torre - com altas concentrações de células e utilizando decantadores como unidade de separação quando a cepa de levedura utilizada possui características floculantes. Neste trabalho alcançaram uma produtividade de 14.4 g<sub>etanol</sub>/L.h.

Viegas et al.(2002) trabalharam com dois reatores, do tipo torre, ligados em série, utilizando leveduras floculantes e obtiveram produtividade máxima de 15,4 g/L.h, mantendo a faixa de rendimento igual a 93%. Genisheva et al. (2013), por sua vez, estudaram o processo contínuo de fermentação alcoólica e maloláctica sequencial para a produção de vinho, no qual utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em caules ou em cascas de uva para a fermentação alcoólica, e as bactérias *Oenococcus oeni* foram imobilizadas somente em cascas de uvas para a fermentação meloláctica. A proposta do processo contínuo integrado permitiu a produção de 960 mL/d de um vinho branco seco, com teor alcoólico de 13% v/v, usando dois

reatores torres de 1,5 L de volume cada um, empacotados com 260g de casca de uva. O vinho era de boa qualidade físico-química e 67% do ácido málico pôde ser reduzido no segundo reator.

Liu et al. (2009) estudaram a fermentação de meios à base de sacarose por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em partículas magnéticas em reatores de leito fluidizados estabilizados magneticamente. As partículas eram solidificadas em uma solução de 2% de  $\text{CaCl}_2$  qual permaneciam estáveis e era mantida alta produção de etanol, atingindo uma produtividade de 26,7 g/L.h a uma carga de partículas de 41%. Quando comparada à produção de etanol pelos leitos magnetizados ou não, a resposta foi maior no leito fluidizado com o campo magnetizado.

Contudo, as desvantagens desses reatores estão relacionadas à transferência de calor com baixa condutividade (ANDRIETTA, 2004). Nestes reatores a taxa de reação pode ser relativamente maior na entrada, pela maior concentração de substrato. Como o escoamento é ascendente, a taxa de liberação de energia ao longo da altura do reator pode não ser uniforme, sendo maior na base do reator (TOLEDO, 1999).

## 2.4 Características bioquímicas da fermentação alcoólica

As leveduras podem fazer uso tanto da fermentação (condição de anaerobiose) quanto da respiração (condição de aerobiose) para a obtenção de energia através da degradação de açúcares. Essa energia química se refere às moléculas de ATP, adenosina trifosfato. A perda de um dos grupos fosfatos libera grande quantidade de energia útil, transformando-se em moléculas de ADP que podem ser novamente fosforiladas, transformando-se assim em novas moléculas de ATP.

A via de respiração para a levedura é mais vantajosa, pois leva à formação de ATP dezenove vezes maior se comparada à via fermentativa. Assim, em condições de anaerobiose a rota é desviada para a fermentação na qual a produção de etanol é apenas uma das excretas de todo processo (VASCONCELOS, 1998).

No que diz respeito às células de leveduras, elas necessitam de condições nutricionais durante o processo de fermentação alcoólica, o que influencia diretamente na multiplicação celular e na eficiência da transformação do açúcar em etanol (RIBEIRO et al., 1987). Como fonte nutricional, estudos revelam a necessidade do nitrogênio, visto que ele é essencial para o crescimento e multiplicação de leveduras, a utilização dos açúcares na

geração de biomassa e produção de carboidratos de reserva, o fósforo para integrar as moléculas de ATP, o enxofre como constituinte dos aminoácidos e a influência dos íons minerais (Zn, Co, Mn, Cu) na atividade enzimática das células (AMORIN, et al., 1996; BELLUCO, 2001).

A via fermentativa para a produção de etanol é a mais utilizada nas indústrias produtoras deste produto. A utilização da cana-de-açúcar comomatera prima para fermentação é a mais promissora no Brasil, pela disponibilidade do mercado e custo como já comentado anteriormente, visto que se trata de uma rica fonte de carbono e de alta concentração de sacarose, seguida por glicose e frutose. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal micro-organismo utilizado neste processo pela sua maior produtividade, adequação ao meio e robustez (ATALA, 2004, CUNHA, 2004).

Do ponto de vista bioquímico, a fermentação alcoólica consiste na conversão da hexose em etanol. Por meio da enzima invertase essas hexoses, glicose e frutose são obtidas pela quebra da sacarose presente no caldo de cana. Durante o transporte para dentro das células, essas hexoses são fosforiladas entrando na glicólise, processo finalizado com a formação do piruvato, conforme Figura 2.2 (CUNHA, 2004).

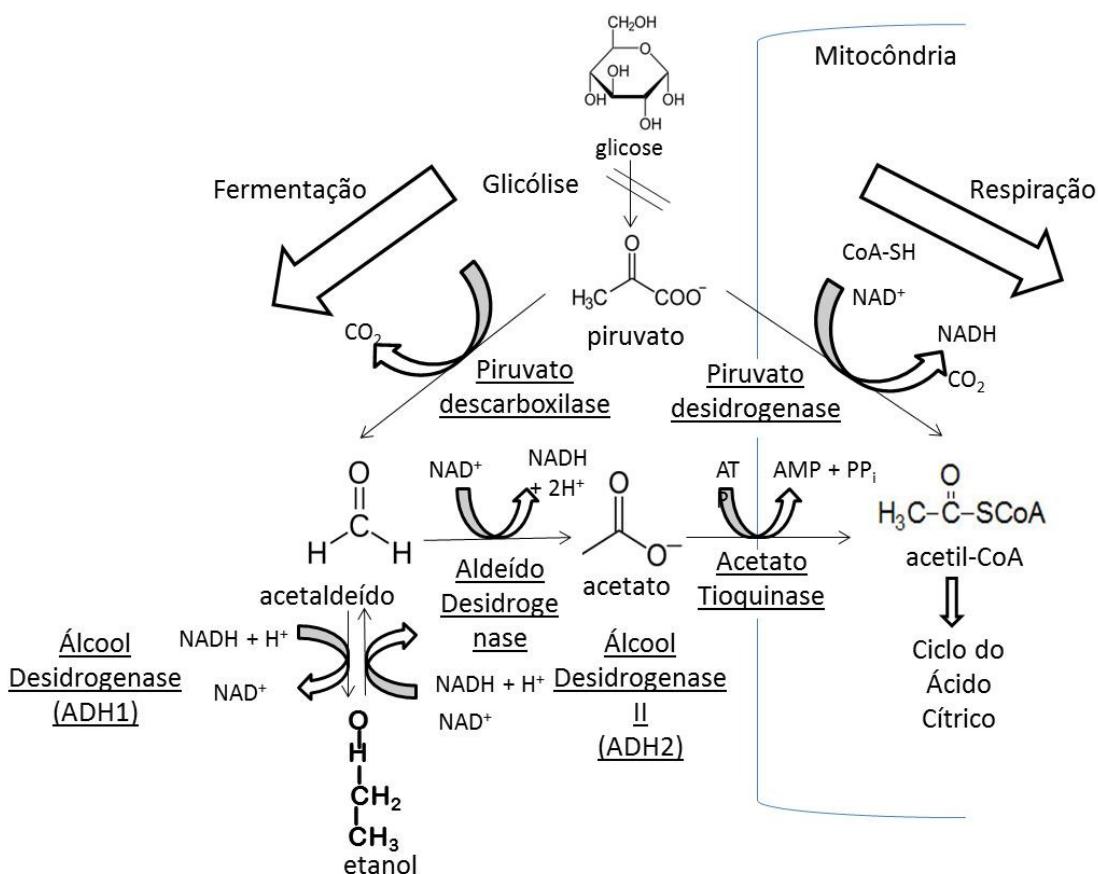


Figura 2.2 – Esquema da fermentação e da respiração  
Fonte: (CUNHA, 2004)

Embora muitos cientistas tenham estudado a produção de etanol por fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, é muito importante o conhecimento de sua via metabólica para estudar melhorias significativas. E, em se tratando de via metabólica, para melhor exemplificar, a principal rota da fermentação é a glicolise, através da qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas, tal como ilustrado na Figura 2.3.

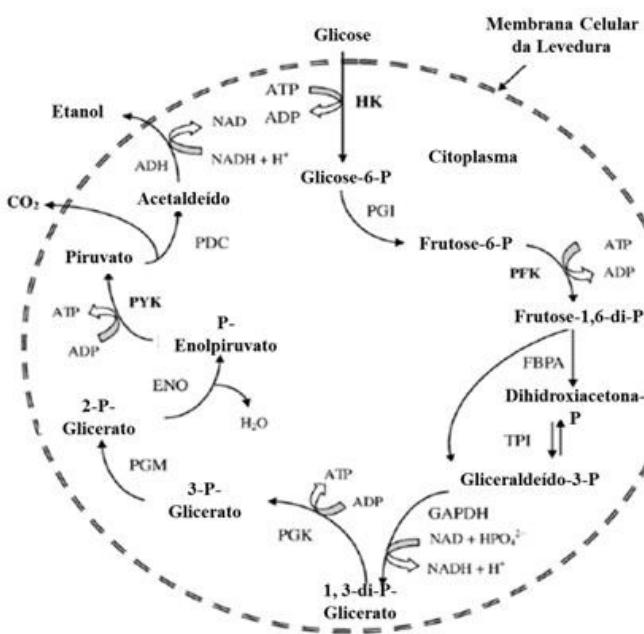


Figura 2.3 – Rota metabólica do *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: Bai 2008, adaptado

Em condições anaeróbias, o piruvato reduz o etanol com liberação de  $\text{CO}_2$ . Teoricamente o rendimento é 0,511 gramas de etanol e 0,489 gramas de  $\text{CO}_2$  para 1,000 gramas de glicolise metabolizada. Duas moléculas de ATP produzidas na glicólise, por molécula de glicose metabolizada, são usados para conduzir as reações de biossíntese das células de levedura. Portanto, a produção de etanol está ligada intimamente com o crescimento das células. Sem o consumo contínuo de ATP para o crescimento das leveduras, o metabolismo glicolítico será interrompido imediatamente, em virtude do acúmulo intracelular de ATP, que inibe a fosfofrutoquinase (PFK), uma das mais importantes enzimas de regulação da glicólise. Por isso, as fermentações com leveduras imobilizadas, principalmente em géis, que retardam o crescimento celular, influenciam negativamente na fermentação alcoólica (BAI et al., 2008).

Além de etanol e CO<sub>2</sub> vários subprodutos são produzidos durante a fermentação alcoólica. Um dos principais subprodutos é o glicerol. Ele é produzido a um nível de 1,0% (w/v) para a maioria dos processos de fermentação alcoólica. Outros subprodutos como ácidos orgânicos e alcoóis superiores são produzidos em níveis muito mais baixos.

#### **2.4.1 Fatores que afetam a fermentação alcoólica**

Vários são os fatores que interferem nas reações catalisadas enzimaticamente e no metabolismo celular. Fatores como concentração de nutrientes, de substrato e de produto, tipos de cepas, pH e temperatura, afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de produção de etanol, crescimento celular e consumo de substrato.

O etanol, por exemplo, foi o primeiro fator a ser reconhecido como tóxico para a fermentação alcoólica e que as leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* são consideradas as de melhor resistência ao efeito inibidor do etanol (ALVES, 1996). O etanol é considerado um dos principais componentes tóxicos da fermentação alcoólica, pois ele age como inibidor não competitivo da rota metabólica. De acordo com o aumento da concentração do inibidor ocorre uma queda proporcional do crescimento celular e da produção de etanol. (MAIORELLA et al., 1993). A diferença de toxicidade exercida pelo etanol varia com a linhagem da levedura, temperatura, composição do meio fermentativo, aeração e outros (ATALA, 2004). VERSTREPEN et al.(2010) citam que os principais efeitos de inibição do etanol em *Saccharomyces cerevisiae* foram: a inibição da multiplicação celular, redução do tamanho das células, queda na velocidade específica de crescimento, aumento da morte celular, mudanças em estruturas celulares, afetando a integridade das membranas e outras organelas.

Alguns estudos detectaram que o efeito tóxico do etanol produzido pela fermentação alcoólica era superior ao efeito do etanol adicionado ao meio fermentativo (NAGODAWITHANA e STEINKRAUS, 1976). Alguns autores suspeitaram que havia um desequilíbrio entre o etanol produzido e o fluxo de etanol através da membrana para o meio fermentativo, o que foi confirmado por Beaven et al., (1982) que demonstrou que as concentrações de etanol intracelulares eram maior que no meio externo de fermentação. Porém Loureiro e Ferreira (1983) demonstraram que a membrana plasmática era altamente permeável ao etanol e o equilíbrio era obtido rapidamente.

Teoricamente a inibição pelo produto e substrato podem ser minimizadas pela utilização de múltiplos estágios em série. Baseado no modelo de simulação, o sistema em dois

estágios com separação de células em cada reator é mais eficiente que o fermentador de estágio único e que o sistema de múltiplos estágios com separação somente no final do processo (NISHIWAKI e DUNN, 1998 *apud* WANG et al., 2013).

Apesar de esforços visando à utilização de outros micro-organismos para a obtenção de etanol em destilarias brasileiras, a utilização da *Saccharomyces cerevisiae* continua sendo a mais adequada, pois se trata de processos não estéreis necessitando de leveduras robustas. Além disso, ela se destaca pela alta eficiência fermentativa, crescimento rápido, habilidade na produção de etanol, consumo de sacarose, tolerância a altas concentrações de etanol e a baixos níveis de oxigênio, osmotolerância e tolerância a grandes variações de temperaturas (ANDRIETTA et al., 2007). Algumas estirpes de *S. cerevisiae*, por exemplo, chegam a produzir 20% (v/v) de etanol, enquanto outras deixam de crescer e fermentar quando atingem 6% (v/v). Contudo, apesar do crescente avanço do conhecimento acerca dos alvos celulares relacionados com a síntese etanol, os mecanismos que estão por trás dos distintos desempenhos das diferentes cepas de leveduras ainda estão longe de serem esclarecidos (FERNANDES, 2008).

Outro fator que interfere na fermentação alcoólica é a temperatura. Diversos trabalhos dizem que a temperatura possui grande influência na cinética microbiana e fermentativa. O aumento tóxico do etanol aumenta com o aumento da temperatura, devido ao aumento da fluidez da membrana celular e transporte das substâncias tóxicas para o interior das células (PHISALAPHONG et al., 2006; FERNANDES, 2008), e especificamente para a *Saccharomyces cerevisiae*, na faixa de 12 a 28°C o efeito tóxico do etanol permanece constante e acima disso aumenta com a temperatura (AMORIN et al., 1996).

Consequentemente, a temperatura é um dos fatores que contribui para modificar a atividade de uma levedura, sendo seu efeito combinado com outras condições ambientais, principalmente com a concentração de etanol, sendo então a toxicidade do etanol uma função da temperatura. As leveduras utilizadas nas destilarias, por exemplo, desenvolvem-se bem na temperatura entre 30 e 33°C (AMORIN et al., 1996). Contudo, como todos os micro-organismos, as leveduras só se multiplicam em determinada faixa de temperatura. Por isso, existem algumas faixas de temperatura bem definidas como: a temperatura mínima de crescimento, na qual abaixo dessa não há crescimento celular das leveduras; temperatura ótima de crescimento, na qual a taxa específica de crescimento é máxima; temperatura máxima de crescimento, acima não se observa aumento do número celular (FERNANDES, 2008).

Na fermentação alcoólica um dos objetivos é diminuir os efeitos inibitórios presentes e aumentar a concentração de etanol, o que tem sido perseguida pela indústria alcooleira pela significativa economia de energia na destilação do etanol e no tratamento de resíduos. A fermentação com alta concentração de levedura (VHG) foi proposta na década de 80, fazendo com que a concentração de etanol aumentasse drasticamente do nível anterior, de 7-8% (v/v) a 10-12% (v/v). Pesquisas em fisiologia das leveduras constatou que algumas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* toleram potencialmente uma maior concentração de etanol do que se acreditava anteriormente. Assim a fermentação alcoólica (VHG), utilizando altas concentrações de sacarose, na ordem de 250 g/L, obtém mais de 15% (v/v) de etanol. A tecnologia de VHG foi proposta por diversos autores na década de 90 (WANG et al., 1999; BAI et al., 2004). Dentre várias tecnologias de fermentação, a fermentação VHG é muito promissora para a aplicação industrial, pois o custo de energia é o segundo custo da produção do álcool, ficando abaixo somente do custo de matériaprima (BAI et al., 2008; WANG et al., 2013).

Basso et al.(2008) observaram que em altas concentrações celulares, altas concentrações de etanol e reciclagem de células levam à redução no crescimento dos micro-organismos e aumentam a conversão de sacarose em etanol, levando a rendimentos em torno de 90 a 92% do valor teórico.

Nos processos de operação de fermentações com alta densidade celular, as leveduras floculantes demonstraram-se muito aptas. As leveduras são completamente preservadas no reator para manter a alta densidade celular e alta taxa de fermentação. Uma elevada densidade celular está relacionada a uma alta produtividade nos processos biotecnológicos (DOMINGUES, 2001). Na tentativa de reter as células nos fermentadores para a produção de etanol, alguns trabalhos estudaram a imobilização das células de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando gel como suporte, mas esse tipo de suporte é uma boa opção, pois restringe o crescimento das células de leveduras (BAI et al., 2008). Uma possível alternativa para manter alta concentração celular no interior dos reatores foi utilizar a filtração por membranas seguida por reciclo, mas isso aumentou os custos do processo. Assim, a utilização de leveduras floculantes tem se mostrado uma boa alternativa devido a sua simplicidade e baixo custo, não havendo a necessidade de suporte (DOMINGUES, 2001; ANDRIETTA et al., 2008; SOARES, 2010).

O custo adicional do material de suporte, o potencial de contaminação de alguns materiais de suporte e a dificuldade no controle da contaminação de micro-organismos fazem das células imobilizadas algo economicamente inaceitável. Por outro lado, as células

floculantes, auto imobilizadas podem efetivamente superar esses inconvenientes (BAI et al., 2008).

#### **2.4.2 Leveduras floculantes**

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 esférico ou oval, não filamentoso, 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 através da degradação de açúcares. Industrialmente, condições são criadas para que as leveduras possam se desenvolver e, paralelamente, produzir etanol em quantidade economicamente viável.

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).

A floculação pode ser definida como a capacidade de certas linhagens de se agregarem espontaneamente e não sexualmente em massas multicelulares, como consequência essa massa pode ser facilmente separada como visto na Figura 2.4 (DOMINGUES, 2001). Na natureza, este tipo de célula de levedura é tecnicamente uma autoimobilização, o que parece ser superior às tecnologias de imobilização a suportes, pois não existe a necessidade do uso desses suportes que possuem particularidades de retenção das células em seu interior, podendo ter um tempo de retenção menor que o esperado. Além disso,

é fácil a manutenção da concentração de biomassa dentro das dornas (BAI et al., 2008). E a principal vantagem das células floculantes é a capacidade de serem recuperadas pela sedimentação no lugar da centrifugação, muito empregada para as células livres, poupando capital de investimento para as centrifugadoras, bem como o consumo de energia para a centrifugação (BAI et al., 2008).

Quanto ao mecanismo físico através do qual ocorre a floculação, ele ainda não é totalmente reconhecido, mas existem algumas teorias que tentam explicar o fenômeno. Na teoria “*lectin-like theory of flocculation*”, por exemplo, sugere-se que as proteínas de superfícies das leveduras floculantes funcionem como lectinas e se liguem a carboidratos na parede celular das células vizinhas (mananas), enquanto as leveduras normais possuem apenas carboidratos em sua parede celular (MIKI et al., 1982).

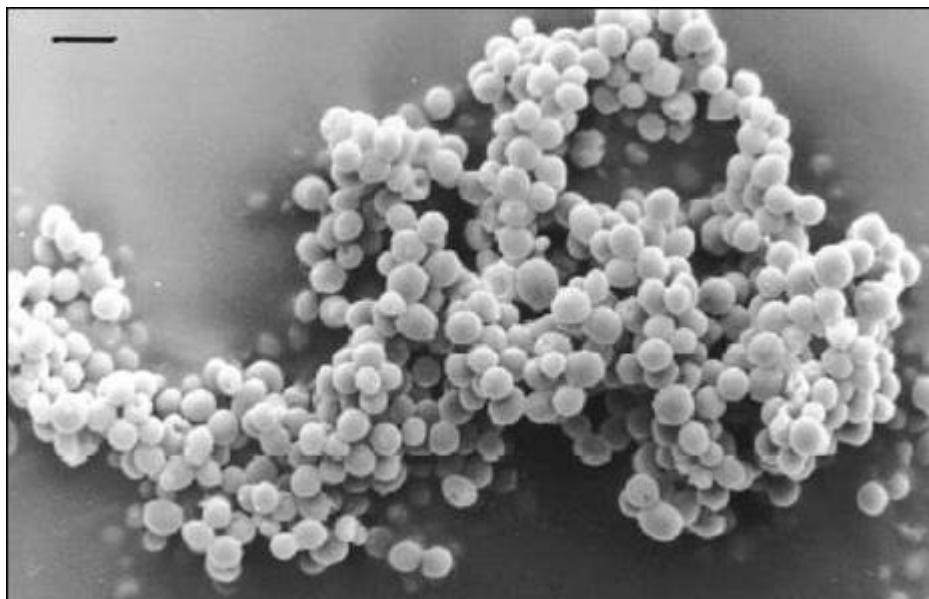


Figura 2.4 - Células floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* observadas em microscopia eletrônica de varrimento (barra corresponde a 10 µm).Fonte: (DOMINGUES, 2001).

Além do mecanismo físico capaz de ligar as células, as leveduras são influenciadas pela sua genética e fatores externos, como a presença de cálcio, etanol, nutrientes, pH e temperatura (DOMINGUES 2001; VERSTREPEN et al., 2003). Os íons cálcio permitem a lectina atingir sua forma ativa, conforme Figura 2.5.

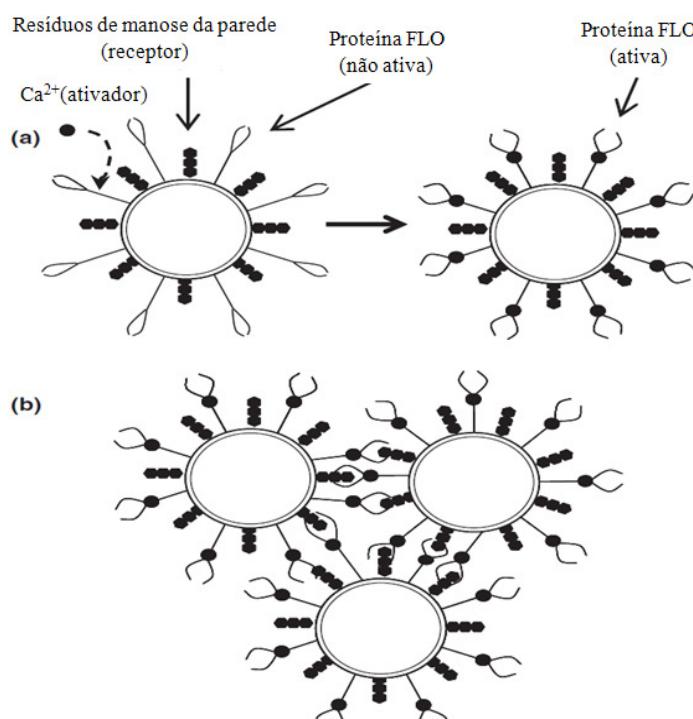


Figura 2.5 - Mecanismo da teoria da lectina na floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (a) íons de cálcio permitem que as lectinas alcancem sua conformação ativa e (b) as lectinas ativam a floculação. Fonte: Soares (2010).

Assim como outras proteínas, as floculinas são codificadas por genes específicos denominados FLO (CUNHA, 2004). A lectina de floculação pode corresponder aos produtos dos genes de floculação dominantes, tais como FLO1 e genes relacionados, que já há algum tempo se sabe que estão relacionados ao processo de floculação (DOMINGUES, 2001). A FLO1 é uma proteína estrutural localizada na superfície da célula de levedura, diretamente envolvida no processo de floculação (BIDARD et al., 1995; BONY et al., 1997). A sequência de aminoácidos deduzida do gene FLO1 revelou uma proteína rica em serina e treonina, sugerindo que a proteína FLO1 é uma proteína integral da membrana e um componente da parede celular (WATARI et al., 1994).

Sob outro aspecto, no estudo de Stratford (1989) verificou-se que a agitação mecânica é requerida para superar a repulsão eletrostática entre as células. A mudança de pH, segundo Calleja (1987), acarreta um efeito profundo na floculação, sendo o pH ótimo dependente de cada cepa.

Quanto à floculação, ela requer a presença de proteínas e receptores de íons na superfície celular, sendo a floculação uma propriedade intrínseca da parede celular. No entanto, não se sabe como fatores regulatórios agem nos genes envolvidos na produção de

proteínas e como estas se tornam receptoras, sendo a regulação da floculação um desafio até o momento (STAN e DESPA, 2000).

Ainda no que se refere à floculação, a presença de íons no meio fermentativo é uma das características importantes do processo de floculação de *Saccharomyces* que já foram identificadas, pois íons  $\text{Ca}^{2+}$  são necessários para induzir o processo; íons  $\text{Na}^+$  e alguns tipos de açúcares têm um efeito inibitório na floculação. A floculação é afetada pelas condições do meio de cultivo e está fortemente relacionada com o aumento da hidrofobicidade da parede celular. A floculação de leveduras consiste em uma interação entre as paredes celulares nas quais as interações em que íons  $\text{Ca}^{2+}$  atuam como cofatores ativando o processo (TEIXEIRA et al., 1995).

Nesse sentido, o trabalho de Machado et al. (2008) utilizou a capacidade de leveduras cervejeiras de *Saccharomyces cerevisiae* de flocular na presença de íons para utilizá-las na biorremediação de efluentes como um sistema de separação barato, natural e eficiente. Os autores utilizaram um efluente carregado de metal o qual passava através de uma série de lotes sequenciais, foi possível alcançar depois do segundo lote, níveis de concentração de  $\text{Ni}^{2+}$ , um dos íons que necessitava que sua concentração fosse diminuída, abaixo do limite legal de descarga de águas residuais no sistema fluvial.

## 2.5 Capacidade fermentativa

Existem várias técnicas tradicionais de identificação de leveduras, mas apesar da importância em identificá-las, elas são incapazes de fornecer características de largo interesse industrial no que se refere, por exemplo, ao seu comportamento fermentativo, na produção do etanol. Entretanto, em 1995, Andrietta et al. propuseram uma diferenciação de leveduras baseado no seu potencial fermentativo. O método de classificação das leveduras para a fermentação alcoólica foi proposto por Andrietta et al. (1999) que utilizaram alguns parâmetros que levam em consideração as características cinéticas, de rendimento e produtividade (STECKELBERG, 2001; MIGLIARI, 2001; GUIDINI, 2013). A capacidade fermentativa classifica as leveduras baseadas nos seguintes parâmetros:

- Rendimento celular ( $\text{Y}_{\text{X/S}}$ ): Esse valor é a relação da massa celular produzida e da massa de substrato consumida. Um valor alto do rendimento 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.

- Rendimento em etanol ( $Y_{P/S}$ ): O rendimento em etanol expressa a massa de etanol produzida em relação à massa de substrato consumida. 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.

- Nível de Conversão de Substrato (NCO): A unidade é expressa em % (g de substrato consumido em relação ao substrato inicial). Além de estar vinculada à velocidade de consumo do substrato, este parâmetro indica 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.

- Velocidade de consumo de substrato (VCS): 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). Quanto maior for este parâmetro, melhor será o micro-organismo escolhido para o processo.

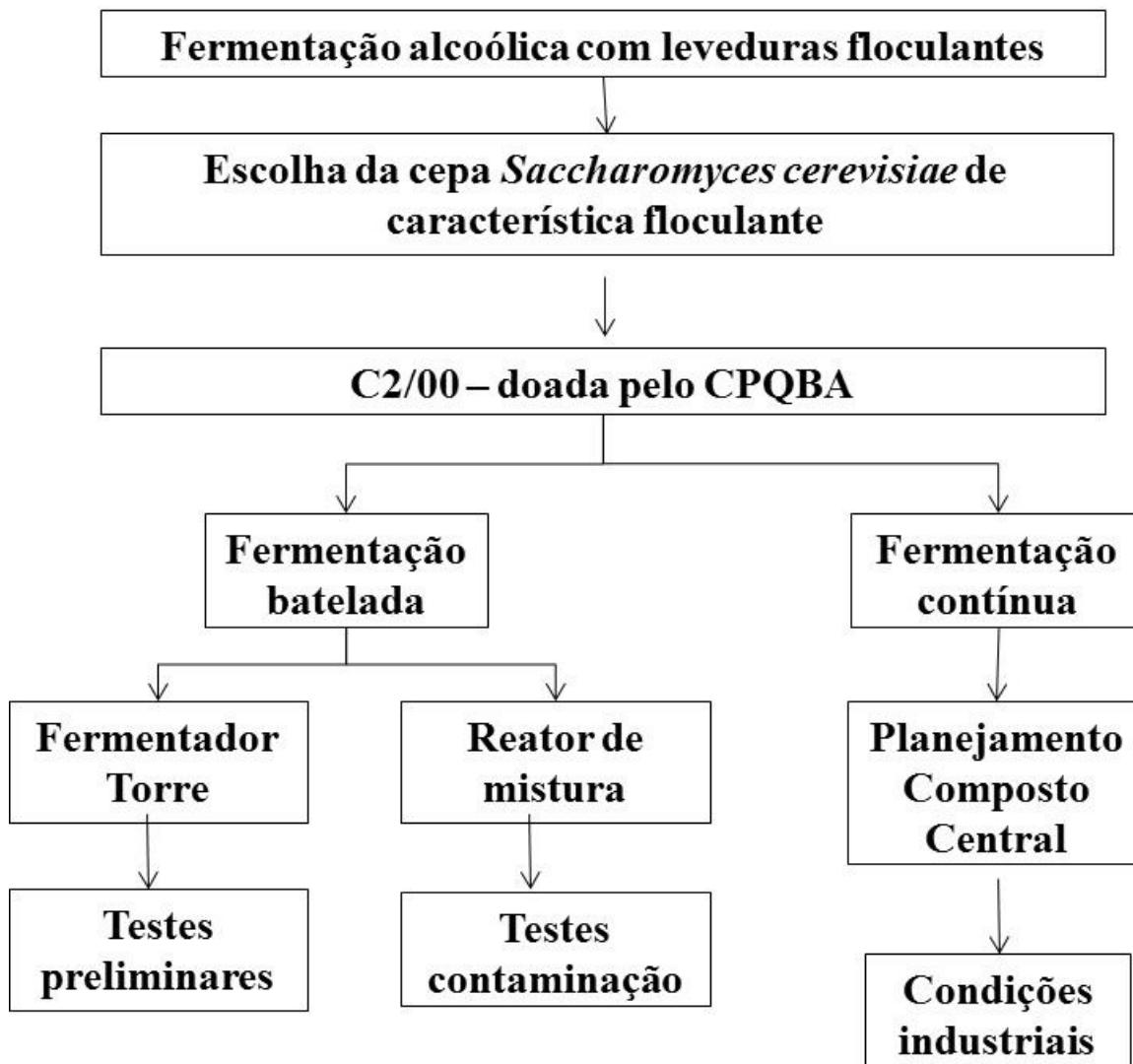
---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

---

Neste capítulo será apresentado o material utilizado no desenvolvimento experimental desta tese, bem como a metodologia empregada para cada etapa. As etapas do trabalho estão ilustradas no fluxograma a seguir:



### 3.1 Material

O material utilizado no trabalho estão especificados.

#### 3.1.1 Unidade experimental

Foram utilizados neste trabalho de fermentação alcoólica com leveduras floculantes alguns arranjos de reatores específicos para os estudos em questão. No início, com objetivo de caracterizar a cepa e analisar seu comportamento, foram realizados testes em batelada empregando um reator torre com recirculação, de volume útil de 3L, com uma camisa para controle de temperatura, a qual foi mantida a  $32 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . O efluente do reator alimentava um erlenmeyer, a partir do qual uma bomba de deslocamento positivo promovia a recirculação do meio em fermentação para o reator, cujo objetivo era promover a mistura no sistema, como mostra a Figura 3.1.



Figura 3.1 - Sistema de fermentação em batelada utilizando um reator torre de 3L de volume útil.

No intuito de verificar o controle da contaminação com bactérias presentes nos caldos-de-cana, foram realizados testes em sistema de batelada em reator de mistura. O reator utilizado foi um fermentador Biostat M (B. BraunCo., Alemanha) operado em batelada e com volume útil de 2L e operado com 1,5L de meio (Figura 3.2). Este reator é dotado de camisa para recirculação de água proveniente de um banho termostatizado, no qual foi mantida a temperatura constante em  $32 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em todos os ensaios.



Figura 3.2 - Fermentador Biostat M B. Braun.

E, finalmente, foi utilizado o sistema de reatores nos experimentos de fermentação alcoólica contínua, composto de dois reatores tubulares de bancada, do tipo torre, ligados em série, de escoamento ascendente, com capacidade útil de 3L cada e dotados de camisa para controle de temperatura. Foram estudados e testados vários arranjos operados continuamente, visando obter um bom funcionamento do sistema:

- Um reator sem recirculação de células;
- Um reator com um decantador na saída do reator, do qual uma corrente de células decantadas era recirculada e o efluente constituía o mosto fermentado ou vinho;
- Dois reatores em série sem recirculação de células;
- Dois reatores em série com um decantador de volume útil 1 L na saída do primeiro reator, recirculação de células decantadas do decantador para o primeiro reator e o sobrenadante enviado para o segundo reator, do qual saia a corrente de mosto fermentado;
- Dois reatores em série com um decantador de volume útil 1 L na saída do primeiro reator, recirculação de células decantadas do decantador para o primeiro reator e o sobrenadante enviado para o segundo reator, do qual a corrente efluente era enviada a um segundo decantador de volume útil 1 L, do qual as células decantadas eram recicladas ao segundo reator e o sobrenadante constituía o mosto fermentado. O esquema final do processo é

apresentado na Figura 3.3, com reatores torre de 75 cm de altura e com 7,5 cm de diâmetro interno com volume útil de 3L cada.

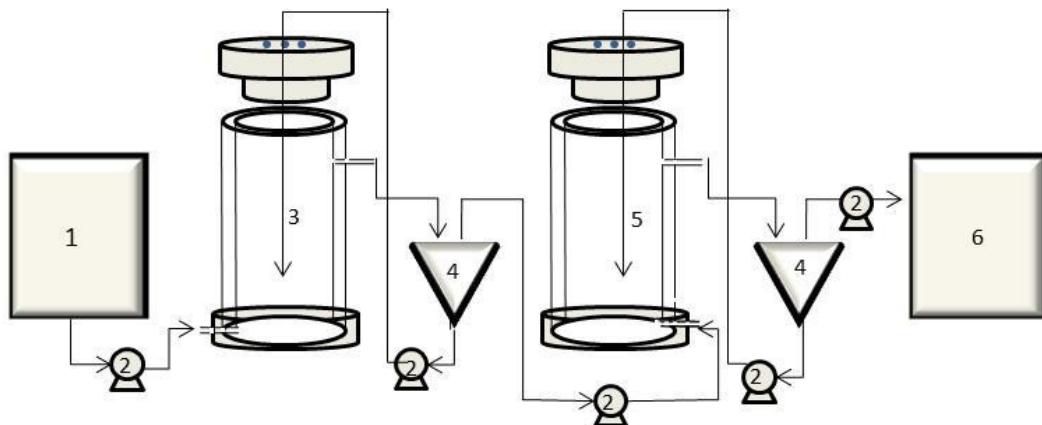


Figura 3.3 - Sistema de fermentação de dois reatores torres conectados em série com decantadores. (1 – tanque de alimentação; 2 – bomba; 3 – primeiro reator; 4 – decantador; 5 – segundo reator; 6 – tanque de vinho).

### 3.1.2 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram leveduras *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes, 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 selecionada na Usina Junqueira (COSAN), doada pelo Centro de Tecnologia Canavieiro (CTC).

A cultura das leveduras foi mantida nos estados líquida e sólida. 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.

### 3.1.3 Meio de cultura

A composição do meio de cultura para as leveduras consistiu-se de sacarose em concentrações variadas,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (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) (PACHECO, 2010). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção do açúcar, o qual foi substituído pelo açúcar cristal comercial.

Em alguns testes finais para a verificação da eficiência do sistema fermentativo em condições industriais, foram utilizados caldo-de-cana e melaço, provenientes da usina Araporã Bioenergia, Araporã, M.G.

### **3.2 Metodologias**

#### **3.2.1 Análise das concentrações de açúcares e álcool**

As concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose), etanol e glicerol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em todos os experimentos. O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, modelo LC-20<sup>a</sup> Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, o fluxo de bomba 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 microlitros.

#### **3.2.2 Concentração e viabilidade celular de leveduras**

A concentração celular foi obtida por massa seca, as amostras foram retiradas do reator, lavadas com água por três vezes, filtradas a vácuo em papel de filtro e colocadas em estufa a uma temperatura de 80°C até que sua massa permanecesse constante. A massa seca era obtida pela diferença entre a massa final e a massa do papel de filtro.

A quantificação de células vivas e mortas foi realizada por contagem em câmara de Neubauer. As amostras foram retiradas do reator e diluídas com solução 5 mM de EDTA em tampão citrato pH 3, mantidas nestas condições por 30 minutos para desfloculação das células, para possibilitar a contagem das mesmas(MATSUMOTO et al., 2002).

A técnica de coloração com azul de metíleno consiste em se misturar partes iguais da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e da solução corante (azul de metíleno). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentar-se-ão coloridas de azul. A porcentagem ou o número de células

viáveis é determinada transferindo-se, com uma pipeta de Pasteur, a amostra para a câmara de Neubauer e para depois ser visualizada no microscópio com aumento total de 400X.

### 3.2.3 Quantificação de bactérias (técnica da microgota)

A contaminação bacteriana foi controlada durante os processos fermentativos e a contagem das unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>) foi realizada pela técnica da microgota em plaqueamento. Neste procedimento, a amostra de meio fermentativo retirado ao longo da fermentação foi diluída de forma seriada em proporções de 1:10, em uma solução salina estéril, preparada com 0,85% de NaCl. Nos tubos de ensaio foram colocados 9,0 mL de solução salina contendo 0,3 a 0,5% de Tween 80 e 1,0mL da suspensão a ser diluída sequencialmente até que se alcançasse diluição de 1,0 x 10<sup>-10</sup>. O Tween foi acrescentado na solução salina para maior dispersão da microgota.

O meio de cultura utilizado para a análise de viabilidade celular de bactérias foi o proposto pela Fermentec para plaqueamento com bactérias lácticas totais, por ser as bactérias lácticas as mais comuns presentes na contaminação do caldo de cana, a composição do meio esta apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 –Composição do meio de cultura para realização do plaqueamento.

Composto	Concentração (g/L)
<b>Peptona</b>	<b>10,0</b>
<b>Extrato de carne</b>	<b>5,0</b>
<b>Extrato de levedura</b>	<b>5,0</b>
<b>Glicose</b>	<b>20,0</b>
<b>Fosfato bibásico de potássio</b>	<b>2,0</b>
<b>Acetato de sódio</b>	<b>5,0</b>
<b>Citrato bibásico de amônio</b>	<b>2,0</b>
<b>Sulfato de magnésio</b>	<b>0,1</b>
<b>Sulfato de manganês</b>	<b>0,05</b>
<b>Agar</b>	<b>15,0</b>

Neste meio foi acrescentado 20 ppm de Nistatina para a melhor contagem das bactérias, pois ele inibe o crescimento de leveduras.

Antes de colocar o meio sobre as placas de Petri, estas foram marcadas com pincéis atômicos em sua parte inferior dividindo-as em quatro partes. Posteriormente, o meio foi colocado em placas de tal forma a fazer com que o fluido formasse um pequeno filme sobre a superfície do vidro. Para que a superfície do filme secasse, as placas foram expostas sem tampa sob luz UV. Ao término desse período, as placas estavam aptas a serem utilizadas nas análises.

Na superfície do meio, dividida em quatro partes, dividida pela marcação com pincel atômico, foi depositada uma microgota de 10  $\mu\text{L}$  em cada  $\frac{1}{4}$  da placa referente à mesma diluição. Assim que cada uma das microgotas era colocada, foram realizados suaves movimentos circulares com a placa de Petri sobre uma superfície plana e lisa, para que estas microgotas se espalhassem melhor sobre o meio. Todo o material utilizado foi esterilizado previamente em autoclave.

Após a incubação, realizou a contagem propriamente do número de unidades formadoras de colônia. Como em uma única placa houve quatro contagens diferentes para uma mesma diluição, contou-se cada uma dessas quatro partes, e tirou-se a média aritmética para determinar o número de colônias a que correspondiam àquela diluição. A placa cuja contagem esteve em uma faixa de 5 a 100 colônias por microgota foi considerada nos cálculos, as outras foram descartadas. De acordo com o número médio de colônias formadas e sua diluição, foi possível determinar o nível de contaminação presente naquela amostra (ROMEIRO, 2009).

### **3.3 Capacidade fermentativa**

A capacidade fermentativa é um sistema de classificação de leveduras que leva em consideração as características cinéticas, de rendimento e produtividade das linhagens. Para esta pesquisa, a capacidade fermentativa foi realizada em *Shaker* com controle de temperatura a 32°C e agitação de 150rpm, em triplicata para cada cepa, em frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo estéril. O fechamento dos frascos foi feito com rolha de algodão para que a saída do CO<sub>2</sub> produzido durante a fermentação ocorresse. Primeiramente, as culturas celulares foram repicadas do meio sólido e meio líquido com aumento progressivo de volume dos erlenmeyers, até obter quantidade de células decantadas

para realizar o estudo da capacidade fermentativa com um volume inicial de células igual a 10% (v/v), de maneira que a concentração inicial de células fosse igual a  $10^8$  células/mL.

Inicialmente e após o tempo de incubação de 24 h, foram analisados o teor de sacarose residual e etanol por cromatografia líquida e a concentração celular obtida por contagem em câmara de Neubauer e por massa seca (STECKELBERG, 2001). Neste sistema de classificação, foram utilizados seis parâmetros sequenciais para a definição do grupo de cada cepa, são eles: Rendimento Celular ( $Y_{x/s}$ ), Velocidade de Consumo de Sacarose (VCS), Nível de Conversão de Substrato (NCO), Produtividade ( $\emptyset$ ) e Rendimento em Etanol ( $Y_p/s$ ).

Cada parâmetro contempla três faixas distintas de valores, sendo: alta, média e baixa. Estas faixas foram definidas de acordo com experiências adquiridas em trabalhos anteriores, mostrados na Tabela 3.2 (ANDRIETTA et al. 1995; ANDRIETTA et al. 1997; MIGLIARI, 2001).

Tabela 3.2- Limites das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas isoladas.

Parâmetro	Nível Alto	Nível médio	Nível Baixo
$Y_{p/s}$ ( $g_{et}/g_{sac}$ )	<b>&gt; 0,044</b>	<b>0,044-0,041</b>	<b>&lt; 0,041</b>
$Y_{x/s}$ ( $g_{cel}/g_{sac}$ )	<b>&gt; 5,7</b>	<b>5,7-5,2</b>	<b>&lt; 5,2</b>
<b>PROD</b> ( $g_{et}/L.h$ )	<b>&gt; 98,5</b>	<b>98,5-90</b>	<b>&lt; 90</b>
<b>VCS</b> ( $g_{sac}/L.h$ )	<b>&gt; 2,4</b>	<b>2,4-2,2</b>	<b>&lt; 2,2</b>
<b>NCO</b> (%)	<b>&gt; 0,45</b>	<b>0,45-0,42</b>	<b>&lt; 0,42</b>
$Y_{p/s}$ ( $g_{et}/g_{sac}$ )	<b>&gt; 0,55</b>	<b>0,55 – 045</b>	<b>&lt; 0,45</b>

Os parâmetros foram calculados pelas seguintes Equações:

Rendimento Celular ( $Y_{x/s}$ )

$$Y_{x/s} = \frac{MX}{MS} \quad (3.1)$$

Onde,

$Y_{x/s}$  = Rendimento celular ( $g_{celulas}/g_{substrato}$ );

$MX$  = Massa celular produzida (g);

$MS$  = Massa de sacarose consumida (g).

Velocidade de Consumo de Substrato (VCS)

$$VCS = \frac{SAC}{V_m * t_f} \quad (3.2)$$

Onde,

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

SAC = Massa de sacarose consumida (g);

$V_m$  = Volume de meio (L);

$t_f$  = Tempo de fermentação (h).

Nível de Conversão de açúcar (NCO)

$$NCO = \frac{MS_i - MS_f}{MS_i} \cdot 100 \quad (3.3)$$

Onde,

NCO = Nível de Conversão de ART (%);

$MS_i$  = Massa de sacarose inicial (g);

$MS_f$  = Massa de sacarose final (g).

Produtividade ( $\phi$ )

$$\phi = \frac{ETOH}{V_m * t_f} \quad (3.4)$$

Onde,

$\phi$  = Produtividade (g/L\*h);

ETOH = Massa de etanol (g);

$V_m$  = Volume de meio (L);

$t_f$  = Tempo de fermentação (h).

Rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ )

$$Y_{p/s} = \frac{ETOH}{SAC} \quad (3.5)$$

Onde,

$Y_{p/s}$  = Rendimento de produto (etanol) (g de etanol/g de substrato);

ETOH= Massa de etanol (g);

SAC = Massa de sacarose consumida (g)

Com os resultados dos parâmetros analisados no estudo da Capacidade fermentativa, foi realizado um teste de Tukey para avaliação das médias obtidas.

### 3.4 Estudo da morfologia das cepas

As seis cepas (C2/00; C4/00; C2/95; CTC; C19 e C14) floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* foram analisadas quanto à sua morfologia colonial através do espalhamento das cepas em estrias nas placas de Petri com o meio WLN (WallersteinLaboratoryNutrientMedium) com o auxílio de alça. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por quatro dias.

O meio WLN é um meio básico para leveduras que evidencia as diferentes morfologias das colônias e a produção de ácido pelas mesmas, através da viragem do indicador verde de bromocresol. A composição deste meio é: glicose 50 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,55 g/L; KCl 0,425 g/L; CaCl<sub>2</sub> · 2.H<sub>2</sub>O 0,125 g/L; MgSO<sub>4</sub> · 7.H<sub>2</sub>O 0,125 g/L; FeCl<sub>2</sub> · 6.H<sub>2</sub>O 0,0025 mg/mL; MnSO<sub>4</sub> · 4.H<sub>2</sub>O 0,0025 mg/mL; caseína hidrolisada enzimaticamente 5g/L; extrato de levedura 4 g/L; agar 20g/L; verde bromocresol 0,022 g/L; ácido nalidíxico 0,05 mg/mL; ampicilina 0,05 mg/mL.

### 3.5 Estudo da influência do pH no desempenho da cepa C2/00

O procedimento experimental foi realizado em triplicata e consistiu em preparar vinte e umerlenmeyers de 250 mL, com 150 mL de meio estéril, nos valores de pH definidos para cada experimento, com concentração de sacarose de 180 g/L. Cada erlenmeyer foi inoculado com 15 mL de suspensão celular, obtendo uma concentração celular de 10<sup>8</sup> células/mL. O pH do meio foi ajustado no início da fermentação com ácido clorídrico 2 M ou hidróxido de sódio 1 M e os valores estudados de pH foram: 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0.

O tempo de incubação foi de vinte e quatro horas em mesa rotatória a100rpm e temperatura 28°C.

### **3.6 Influência da temperatura na floculação de *Saccharomycescerevisiae* (C2/00)**

As fermentações alcoólicas foram realizadas em erlenmeyers com meio de cultura em uma concentração inicial de sacarose de 160 g/L, em mesas rotatórias com agitação de 100 rpm, durante 10 horas. A redução da concentração de sacarose inicial para 160 g/L nos testes preliminares subsequentes, foi baseada na quantidade alta de açúcar residual encontrada nos experimentos da influência do pH. A concentração inicial de leveduras foi de 10% (v/v), o que correspondia a  $10^8$  células/mL. As temperaturas estudadas foram 20, 25, 30, 32, 35 e 40°C. No final da fermentação foram analisadas qualitativamente o formato dos flocos das leveduras e o rendimento, produtividade e concentração residual de sacarose.

### **3.7 Influência da agitação na floculação de *Saccharomycescerevisiae*(C2/00)**

Nos experimentos para estudar a influência da agitação nos flocos das leveduras com características floculantes, utilizou-se erlenmeyers e mesas rotativas nas seguintes agitações, a saber: 50, 100 e 150 rpm. As fermentações utilizaram meio sintético com concentração de sacarose de 160 g/L, pH 4,5, temperatura de 32°C e concentração celular de 10% (v/v) durante quinze horas. A análise qualitativa foi realizada por fotografias e observações do tamanho dos flocos e a uniformidade dos mesmos. Além disso, foideterminado o rendimento, a produtividade e a concentração residual de sacarose da fermentação.

### **3.8 Velocidade específica de sedimentação.**

Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método descrito por Stratford eKeenan (1988). As seis cepas C2/00, C19, C14, C4/00, CTC e C2/95 foram estudadas em fermentações realizadas em erlenmeyers com 100 mL de meio a 160 g/L de concentração de sacarose inicial, inoculadas com células correspondentes a 10% do volume do meio. Após a fermentação, 40 mL do meio fermentado foi centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos. A massa de células precipitada foi resuspensa em água e recentrifugada por

duas vezes. Um grama de precipitado foi diluído em 100 mL de água, submetido a uma agitação intensa e realizada a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm durante dez minutos, em intervalos de trinta segundos.

A velocidade específica de sedimentação foi obtida pela Equação (3.6).

$$VES = \frac{\left(1 - \frac{Abs_t}{Abs_0}\right)}{t - t_0} \quad (3.6)$$

Onde: VES = velocidade específica de sedimentação

Abs = absorbância

t = tempo

### 3.9 Estudo da influência do pH na velocidade de sedimentação de *Saccharomyces cerevisiae* C2/00

O estudo da sedimentação da levedura C2/00 foi realizado em diferentes valores de pH, com o objetivo de verificar qual o valor de pH no qual a levedura obtém 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 erlenmeyer de 500 mL, sendo 300 mL de meio fermentativo de concentração inicial de sacarose de 160 g/L, com concentração celular de 15% (v/v) em relação ao volume do meio fermentativo, e duração da fermentação de quinze horas à temperatura ambiente e agitação de 100 rpm em mesa rotatória. Após a fermentação foram retirados alíquotas de 30 mL do vinho fermentado e centrifugadas a 8000 rpm por cinco minutos. O precipitado formado foi ressuspensoduas vezes em água destilada e novamente centrifugado. O pH da água destilada foi ajustado para cada experimento com HCl0,5 M e NaOH0,5 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 acompanhada a absorbância, durante dez minutos (de trinta em trinta segundos), em um comprimento e onda de 600 nm. A velocidade específica de sedimentação (VES) foi calculada pela Equação 3.9 (VIEGAS, 1999; VIEGAS, 2003).

### 3.10 Estudo da velocidade de sedimentação em proveta

O estudo da sedimentação em proveta foi realizado com meio fermentativo do interior do primeiro decantador, ou seja, aquele colocado para a recirculação de células

noprimeiro reator torre, conforme Figura 3.3. Esse meio utilizado no ensaio, foi retirado do decantador no experimento utilizando tempo de residência de seis horas em estado estacionário e colocado em uma proveta de 500 mL. O vinho contido na proveta foi homogeneizado e depois deixado em repouso para a realização da leitura da posição de sedimentação em função do tempo.

### **3.11 Sistema de fermentação em batelada**

Foram realizados testes em batelada, em um fermentador torre, para estudar o efeito do reciclo de células e o comportamento da mesma. Em batelada, também em um fermentador de mistura, estudou-se o controle da contaminação por antibióticos naturais e comerciais.

#### **3.11.1 Estudos da fermentação em um reator tipo torre em batelada**

Os experimentos foram realizados em um reator tubular de bancada, do tipo torre, com capacidade útil de 3L, encamisados, e que manteve sua temperatura constante em  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . A fermentação foi em batelada com concentração inicial de sacarose igual a 160 g/L, em escoamento ascendente, e o meio de cultura encontrava-se com pH inicial ajustado a 4,5. A recirculação de meio e células foi realizado com a ajuda de um erlenmeyer de capacidade de 2,5L, o qual recebia a corrente de saída do topo do reator. Esta era agitada no interior do erlenmeyer com ajuda de um agitador magnético para manter a uniformidade do meio. Com auxílio de uma bomba de deslocamento positivo, esse meio agitado era inserido no fundo do reator torre completando o ciclo da recirculação e mantendo a fermentação sob agitação. Foram utilizadas duas vazões de recirculação, 6 mL/s e 30 mL/s.

O volume de inóculo correspondia a 30% do volume total do reator, com concentração de células  $1.10^8$  células/mL. Foram feitas análises nos três pontos do reator (entrada, parte central e saída), e os parâmetros avaliados foram: consumo de sacarose, concentração celular e produção de etanol.

### **3.11.2 Estudo da utilização de antibiótico natural e comercial para controlar a contaminação da fermentação alcoólica com leveduras floculantes**

O objetivo do estudo da utilização de antibiótico natural e comercial, com o intuito de controlar a contaminação da fermentação alcoólica com leveduras floculantes, foi verificar a influência destes antibióticos nas leveduras com características floculantes. Os agentes antibacterianos utilizados nos processos fermentativos foram um antibiótico natural Beta Bio (Hopsteiner Trading (Zhuhai) Co.,Ltda.), um extrato de lúpulo, predominantemente com  $\beta$ -ácidos  $45 \pm 15\%$  dissolvido em propileno glicol de grau alimentício  $35 \pm 5\%$ , o antibiótico comercial Kamoran (Química Real Brasil), ampicilina e ácido nalidixílico.

O contaminante foi obtido através da exposição do caldo de cana ao ambiente durante sete dias, fazendo com que o caldo fosse contaminado naturalmente. Este caldo contaminado foi centrifugado, decantado e a fase decantada (cultura mista) foi armazenada a  $5^{\circ}\text{C}$  e depois adicionada ao decantado celular de *Saccharomyces cerevisiae* floculante. O decantado celular utilizado foi de 150 g o qual corresponde a 10% (v/v) do reator. Esse decantado celular tem uma contaminação de  $10^{10}$  UFC/mL e concentração de leveduras de  $10^8$  células/mL.

A contaminação nas fermentações foi estudada em batelada, com concentração inicial de sacarose 160 g/L, em um fermentador Bioflo 110, de volume útil igual a 1,5 L, controlando a temperatura em  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e uma agitação de 50 rpm. Foram realizadas fermentações com contaminação induzida para a verificação da eficiência dos antibióticos, assim, foram realizadas fermentações com a levedura floculante sem e com a presença de contaminação induzida. Na tentativa de controlar a contaminação foram testadas as concentrações 1, 3 e 6 ppm de Kamoran; 5, 20, 35 e 45 ppm de Beta Bio e 50 ppm de ampicilina e ácido nalidixico. As concentrações dos antibióticos correspondiam ao recomendado pelo fabricante e após os resultados alguns valores próximos foram testados.

Durante o processo fermentativo de dez horas foram analisados o rendimento, a produtividade da fermentação alcoólica e a contagem de células contaminadas por meio de plaqueamento pela técnica da microgota.

### **3.12 Utilização de fermentadores torre em série em operação contínua**

Após os estudos do comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes C2/00 em batelada, iniciou-se o estudo do processo de fermentação

contínua utilizando dois fermentadores tipo torre ligados em série. Cada fermentador apresentava capacidade útil de 3L, formato cilíndrico, de altura 75 cm e diâmetro 7,5 cm, e foram dotados de camisa para controle de temperatura por circulação de água proveniente de um banho termostático. A seguir, esses estudos são descritos de forma mais detalhada.

### 3.12.1 Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares com objetivo de definir o processo fermentativo, para eliminação de possíveis erros no processo e também para verificar a adequação do sistema montado para dois fermentadores, do tipo torre operando em série de forma contínua com *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes.

Inicialmente, houve o processo de adaptação dos micro-organismos nos reatores torres, que foi realizada da seguinte maneira: o inóculo utilizado na partida do sistema foi preparado em 16 erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio esterilizado composto de: sacarose (125 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). Cada erlenmeyer foi inoculado com dois “slants” de cultura sólida após crescimento de quarenta e oito horas. Os frascos foram incubados em mesa rotatória por vinte e quatro horas, a 32°C a 150 rpm (VIEGAS, 2003).

Foram adicionados em cada reator torre 800 mL de inóculo, iniciando a fase de adaptação, com uma vazão de entrada de 10 mL/min do meio reacional contendo 125 g/L de sacarose durante sessenta horas, funcionando individualmente. Os reatores foram ligados em série e foram adicionados, gradativamente, mais 200 g de um decantado de células em cada reator. Em processo contínuo, o sistema foi mantido por mais setenta e duas horas com a mesma vazão de alimentação, aumentando a concentração de sacarose para 180 g/L, obtendo uma concentração final de células de 10% (v/v) e  $10^8$  células/mL.

Depois de obtida essa concentração celular de  $10^8$  células/mL no interior de cada reator, analisou-se o comportamento durante as fermentações alcoólicas nos dois reatores torres em série funcionando continuamente. Inicialmente, foi realizado um estudo com meio de alimentação de 180 g/L de sacarose inicial e com tempos de residência, no interior do sistema, de dezessete e doze horas. As fermentações foram monitoradas por amostragens periódicas do meio em fermentação, em diferentes pontos do reator (A ao G), conforme Figura 3.4.

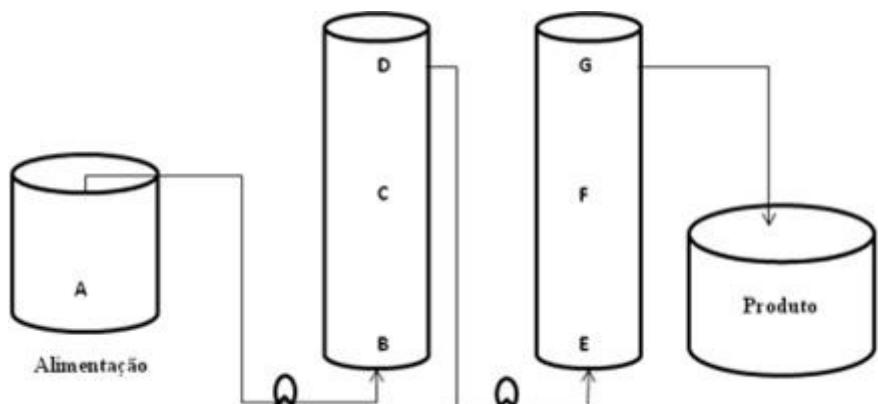


Figura 3.4 - Esquema dos ensaios experimentais preliminares ( fermentadores de 75 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro interno, sendo 3 L de volume útil cada).

Após os testes com tempo de residência de doze e dezessete horas, foram realizadas várias fermentações nos quais se variou a concentração de sacarose, tempo de residência, concentração de extrato de levedura e pH de alimentação para analisar o comportamento e operacionalidade dos reatores e a influência dessas variáveis na produtividade e rendimento da fermentação alcoólica.

### 3.13 Planejamentos Composto Central

No planejamento composto central as fermentações foram realizadas controlando a temperatura em 32°C, pH do meio de alimentação de 5 e concentração de 6 g/L de extrato de levedura, condições estas encontradas como satisfatórias nos testes preliminares.

Para análise da interação entre as variáveis de entrada e o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas obtidas utilizou-se a técnica do planejamento experimental, sendo realizada a otimização por análise da superfície de resposta. Assim, foi necessário, primeiramente, programar ensaios por meio de um planejamento experimental em que se selecionou um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então foi possível executar experimentos com todas as possíveis combinações.

Foi realizado um Delineamento Composto Central (DCC) com dois níveis originais, utilizando-se o software *Statistica* 7.0, tendo-se 2<sup>3</sup> pontos fatoriais, 2 x 3 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando dezessete experimentos.

A concentração de sacarose variou de 191 g/L a 259 g/L, a vazão de reciclo de decantado do primeiro decantador para o primeiro reator foi de 1,6 mL/s a 8,4 mL/s e o tempo de residência de 3,3 h a 8,7 h. A vazão de reciclo de decantado do segundo decantador para o

segundo reator foi mantida constante e igual a 5 mL/s. Esse valor foi definido após vários testes experimentais, de forma a manter a biomassa agitada no segundo reator. O alfa de ortogonalidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,35313 e as equações de codificação para a concentração de sacarose na alimentação ( $S_0$ ), vazão de reciclo no primeiro reator (V) e tempo de residência (T) são mostradas, respectivamente, nas Equações 3.7, 3.8 e 3.9.

$$X_1 = \frac{(S_0 - 225)}{25} \quad (3.7)$$

$$X_2 = \frac{(V - 5)}{2,5} \quad (3.8)$$

$$X_3 = \frac{(T - 6)}{2} \quad (3.9)$$

Na Tabela 3.3 podem ser vistos os valores utilizados no Planejamento experimental para as três variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.3 - Valores utilizados no planejamento para as três variáveis independentes.

	$-a$	-1	0	1	$+a$
$S_0$ (g/L)	<b>191</b>	<b>200</b>	<b>225</b>	<b>250</b>	<b>259</b>
V (mL/s)	<b>1,6</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	<b>7,5</b>	<b>8,4</b>
TR (h)	<b>3,3</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8,7</b>

As faixas de concentração inicial de sacarose e do tempo de residência foram determinadas através de testes preliminares visando à funcionalidade dos dois reatores e obtendo um rendimento e uma produtividade significativos. Os valores utilizados na taxa de reciclo foram determinados por testes preliminares que mostraram um bom funcionamento do sistema, visto que sem reciclo era impossível o funcionamento do mesmo, pois as células floculantes obstruíam a passagem nas mangueiras que interligavam os reatores.

A Tabela 3.4 mostra a matriz do delineamento composto central com valores codificados e originais das variáveis em estudo. Para o desenvolvimento de tal estudo, os ensaios foram realizados de forma aleatória, a fim de evitar tendenciosidade dos resultados.

Tabela 3.4 - Matriz do DCC com valores codificados e originais das variáveis.

Experimentos	X <sub>1</sub> (S <sub>0</sub> – g/L)	X <sub>2</sub> (V – mL/s)	X <sub>3</sub> (T - h)
1	-1 (200)	-1 (2,5)	-1 (4)
2	-1 (200)	-1 (2,5)	+1 (8)
3	-1 (200)	+1 (7,5)	-1 (4)
4	-1 (200)	+1 (7,5)	+1 (8)
5	+1 (250)	-1 (2,5)	-1 (4)
6	+1 (250)	-1 (2,5)	+1 (8)
7	+1 (250)	+1 (7,5)	-1 (4)
8	+1 (250)	+1 (7,5)	+1 (8)
9	- $\alpha$ (191)	0 (5)	0 (6)
10	+ $\alpha$ (259)	0 (5)	0 (6)
11	0 (225)	- $\alpha$ (1,6)	0 (6)
12	0 (225)	+ $\alpha$ (8,4)	0 (6)
13	0 (225)	0 (5)	- $\alpha$ (3,3)
14	0 (225)	0 (5)	+ $\alpha$ (8,7)
15 (C)	0 (225)	0 (5)	0 (6)
16 (C)	0 (225)	0 (5)	0 (6)
17 (C)	0 (225)	0 (5)	0 (6)

### 3.14 Caracterização hidrodinâmica dos reatores

Foi realizada a caracterização hidrodinâmica dos reatores torre em série – representada esquematicamente, nas Figuras 3.6 e 3.7, para determinar a distribuição dos tempos de residência para o sistema 1 e 2, respectivamente. Para isso, empregou-se a técnica de estímulo e resposta (LEVENSPIEL, 1974) utilizando cloreto de sódio P.A. (5 g/L) como traçador. Foram estudados dois tempos de residência, o primeiro para o sistema 1 foi realizado

nos testes preliminares para certificar se o tempo de residência teórico era próximo ao tempo de residência real, pois essa resposta guiaria todos os estudos subsequentes. Após os resultados do Planejamento Composto Central, foi realizado outro estudo para determinação do tempo de residência do sistema 2. Para isso utilizou as condições do ponto ótimo obtido no estudo do planejamento, concentração de sacarose na alimentação de 225 g/L, vazão de reciclo no primeiro reator de 5 mL/s e tempo de residência de 6 h. Esse estudo teve como objetivo certificar se a implementação dos decantadores com as respectivas vazões de reciclo interferiram no tempo de residência real.

Os dois ensaios realizados na presença de biomassa com concentração de  $10^8$  células/mL e pH de 5,0 na alimentação do sistemas. O tempo total do experimento foi em média duas vezes o tempo de detenção hidráulico teórico. O tempo de residência de dezessete horas utilizado nestes experimentos foi baseado no trabalho de Andrietta et al. (2008), e o tempo de seis horas foi baseado no ponto central do planejamento composto central, proposto para analisar a influência da concentração inicial de sacarose, a vazão de reciclo dodecantador para o primeiro reator e o tempo de residência do sistema.

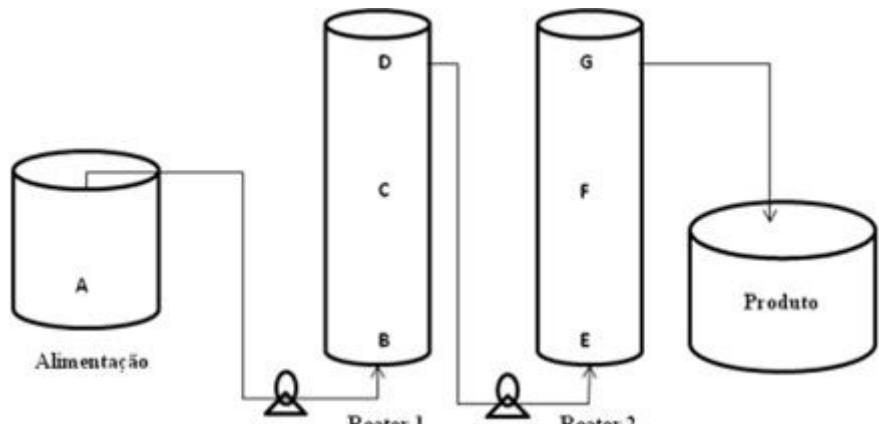


Figura 3.5 - Sistema 1 da fermentação alcoólica.

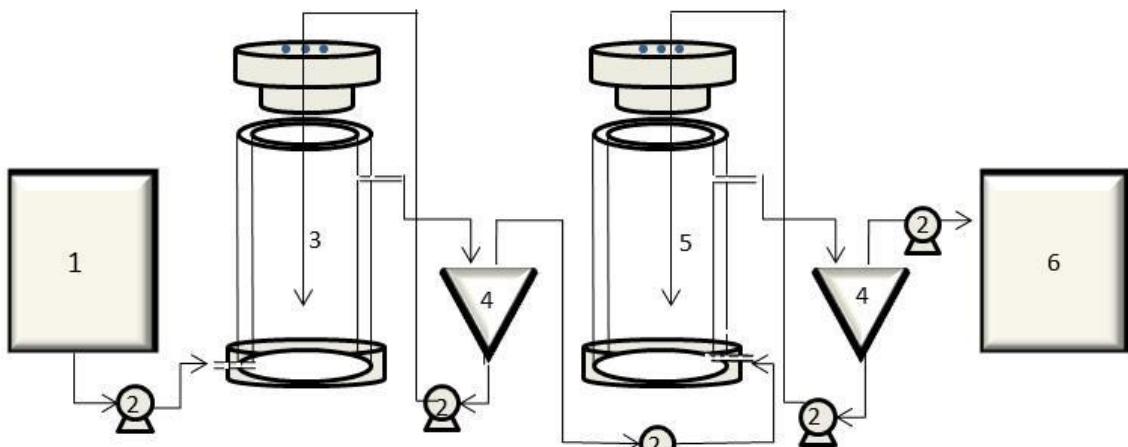


Figura 3.6 - Sistema 2 da fermentação alcoólica.

Os ensaios seguiram os seguintes passos e cálculos:

Cálculo do tempo de residência:

A solução de cloreto de sódio misturada ao meio foi bombeada de um reservatório externo por uma bomba peristáltica, utilizando uma mangueira Tygon L/S 13. Um condutivímetro (RADELKIS modelo OK – 114) foi acoplado à saída do segundo reator para medir a condutividade elétrica do produto em intervalos de tempo pré-determinados.

O traçador foi introduzido ao sistema de forma a produzir uma perturbação na concentração. Determinou-se então a função resposta  $F$  que está representada pela Equação 3.10:

$$F(t) = \frac{\lambda_1 - \lambda_0}{\lambda_\infty - \lambda_0} \quad (3.10)$$

Sendo:  $\lambda_1$  – Condutividade elétrica na saída do reator em cada instante.

$\lambda_0$  – Condutividade elétrica na saída do reator no tempo inicial.

$\lambda_\infty$  – Condutividade elétrica na saída do reator no tempo final.

A área acima da curva foi calculada pela diferença entre a área total e a área abaixo da curva, calculada pelo *software Origin 7.0*.

O tempo de residência teórico foi calculado pela Equação 3.11.

$$\tau_{teo} = \frac{V_R}{v} \quad (3.11)$$

Sendo:  $V_R$  – Volume do reator e tubulações ( $L^3$ )

$v$  – vazão utilizada ( $L^3 \cdot t^{-1}$ )

Cálculo do Número de Dispersão:

O grau de dispersão pode ser baseado no número de Peclet, que foi calculado apenas para o processo com biomassa, pelo cálculo da variância, que representa o efeito de dispersão da distribuição, utilizando as Equações 3.12, 3.13 e 3.14.

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (3.12)$$

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau) E(t) dt \quad (3.13)$$

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} = 2 \frac{1}{Pe} - 2 \left( \frac{1}{Pe} \right)^2 (1 - e^{-Pe}) \quad (3.14)$$

Sendo:  $\sigma_{\theta}$  = variância adimensionalizada;

$Pe$  = número de Peclet;

$\tau$  = tempo de residência médio.

O número de Dispersão ( $ND$ ) é considerado a razão entre a taxa de transporte por difusão ou dispersão e a taxa de transporte por convecção e é dado pela Equação 3.15:

$$ND = \frac{D_{ax}}{uL} = 1/Pe \quad (3.15)$$

**3.15 Teste da influência da concentração de melaço na floculação e no rendimento da fermentação alcoólica**

Foram realizados experimentos durante quinze horas em erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de meio e 10% (v/v) de concentração celular, controlando temperatura a 32°C e rotação de 150 rpm em mesa rotatória, variando a concentração de melaço em caldo de cana de 10%, 20% e 30%, que correspondia em ART, 163,34; 179,34 e 195,32 g/L respectivamente. Foram retiradas fotos e analisadas qualitativamente a floculação das células, além de medir rendimento, produtividade e concentração residual de sacarose da fermentação alcoólica.

### **3.16 Fermentações em reatores contínuos com caldo de cana**

O caldo de cana foi fornecido pela empresa Araporã Bioenergia e foi alimentado no sistema de reatores por uma bomba peristáltica. A fermentação ocorreu a 32°C, com tempo de residência do sistema de seis horas, utilizando uma vazão de recirculação celular de 5 mL/s. A concentração de sacarose inicial do caldo de cana foi de 147,26 g/L. As condições de processo foram iguais ao resultado ótimo obtido pelo planejamento composto central. O sistema foi operado até atingir as condições de estado estacionário para depois o rendimento e a produtividade serem mensurados.

### **3.17 Estabilidade da fermentação alcoólica no sistema contínuo**

Após a realização do Planejamento Composto Central e identificação das condições ótimas, para a realização da fermentação alcoólica, de forma contínua em dois reatores torre com recirculação celular utilizando leveduras de características floculantes, foi mantido o processo contínuo com 225 g/L de concentração de sacarose na alimentação do sistema, tempo de residência de seis horas e vazão de recirculação celular de 5 mL/s, no estado estacionário, analisando durante dezessete dias a produtividade, o rendimento e a concentração residual de sacarose.

---

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão da escolha da cepa, através de estudos da capacidade fermentativa, da morfologia e das condições operacionais das cepas em relação ao pH, temperatura e agitação. Posteriormente, já selecionada a cepa C2/00, são apresentados o estudo em um fermentador de mistura no processo batelada e o controle da contaminação utilizando esta levedura. Na sequencia, como foco principal do trabalho, é apresentado o estudo nos dois fermentadores tipo torre ligados em série em processo contínuo. Foram estudados processos para a melhoria do processo fermentativo, sendo eles: aplicação do reciclo de células, alterações de concentração de sacarose e alteração de tempos de residência.

#### **4.1 Avaliação da capacidade fermentativa**

Somente no processo industrial de fermentação é possível a seleção de cepas mais resistentes e de maior eficiência no processo, mas o uso do teste de capacidade fermentativa foi importante para a escolha dentre as leveduras de características floculantes disponíveis, detectar aquela que apresenta os melhores resultados dos parâmetros analisados para a fermentação.

As seis cepas estudadas floculantes apresentaram aspectos dos flocos e parâmetros cinéticos bastante diferenciados. Durante o estudo da capacidade fermentativa observou-se que a cepa C19 misturou perfeitamente com o meio sem formar flocos e sua sedimentação foi lenta. As cepas C14 e C2/95 formam flocos menores, enquanto as cepas CTC, C2/00 e C4/00 formam flocos de maiores dimensões, como observado na Figura 4.1. Observou-se que a sedimentação é mais rápida quanto maior for o tamanho dos flocos e um aumento da intensidade de agitação provoca uma diminuição no tamanho dos mesmos, fato este observado por Domingues, (2001).

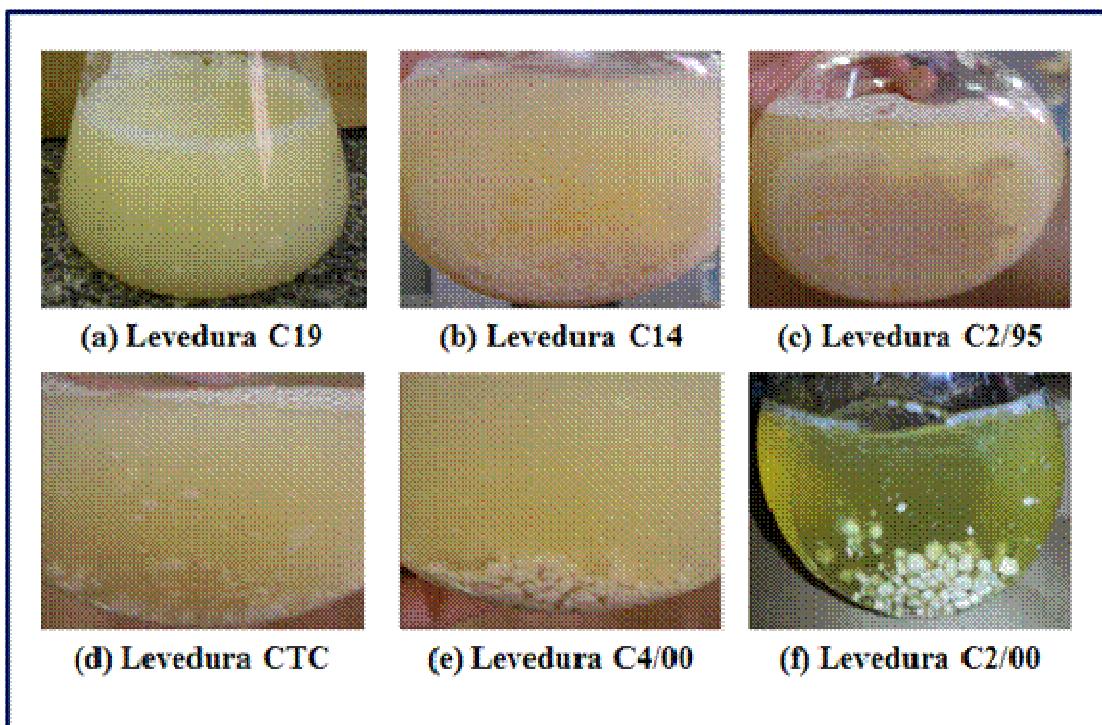


Figura 4.1 – Comportamento das leveduras em meio fermentativo, (a) C19, (b) C14, (c) C2/95, (d) CTC, (e) C4/00 e (f) C2/00

Os resultados obtidos para os parâmetros estudados relativos à capacidade fermentativa de cada cepa de *Saccharomyces cerevisiae* estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Parâmetros cinéticos obtidos para cada cepa:  $Y_{p/s}$  ( $g_{cel}/g_{sac}$ ),  $Y_{x/s}$  ( $g_{cel}/g_{sac}$ ), PROD ( $g_{cel}/L.h$ ), VCS ( $g_{sac}/L.h$ ), NCO (%).

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

Tratamentos seguidos de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey, com  $\alpha=5\%$ .

Os melhores resultados da velocidade de consumo do substrato (VCS) e do nível de conversão (NCO) foram obtidos pela cepa C2/95, que faz com que esta seja classificada como nível alto, de acordo com a Tabela 3.2 do item 3.2.4 de materiais e métodos. A cepa C2/00 apresentou os parâmetros VCS e NCO muito próximos àqueles da cepa C2/95 e pode ser

classificada também como de alto nível, pela análise de Tukey, não houve diferença entre as médias obtidas por estas duas leveduras.

Analizando os resultados para o rendimento celular ( $Y_{X/S}$ ), verifica-se que as cepas (C14 e C4/00) apresentaram os maiores resultados em comparação com as outras cepas, que em relação a Tabela 3.2 classificam-se no nível alto. Esses valores altos indicam um maior desvio de açúcar para a produção de células em detrimento à produção de etanol. Em casos onde existem unidades de secagem de células esta produção excedente pode ser aproveitada na produção de ração, minimizando o prejuízo (STECKELBERG, 2001). O resultado de  $Y_{X/S}$  obtido, empregando a cepa C2/00, é compatível para aplicação industrial, segundo esta análise, pois pode ser considerado de nível médio, desviando menos açúcar para crescimento que as duas outras cepas. A escolha de uma cepa para emprego em um processo deve ser orientada pela análise conjunta de parâmetros e não isoladamente.

Pode-se observar pelos dados da Tabela 4.1 que a cepa com maior rendimento em etanol ( $y_{p/s}$ ) e produtividade ( $\emptyset$ ) foi a cepa C2/00 e com base na Tabela 3.2 representa um nível alto de produção, sendo a única dentre as estudadas que alcançou este nível de rendimento em etanol. Quanto maior for o parâmetro produtividade, mais rápida será a transformação de açúcares em etanol durante o processo fermentativo (MIGLIARI, 2001).

Viegas, (1999) estudou a capacidade fermentativa de 15 cepas isoladas de processos industriais e os melhores resultados de capacidade fermentativa que obteve em relação ao rendimento em etanol e produtividade foram  $0,48 \text{ g}_{et}/\text{g}_{sac}$  e  $2,99 \text{ g}_{et}/\text{L.h}$ , resultados estes menores do que os obtidos no presente trabalho para a cepa C2/00.

Portanto, a cepa floculante *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, doada pelo CPQBA, foi a que apresentou os melhores resultados de capacidade fermentativa em geral, sendo a mais apta para a fermentação alcoólica, quando comparada às outras cepas. A produtividade e o rendimento foram os maiores resultados obtidos e a velocidade de consumo do substrato e a conversão de sacarose foram bons quando comparados a outras cepas. Além disso, a cepa C2/00 apresentou flocos bem definidos características interessante para o trabalho em questão. Por isso, a cepa escolhida para a continuação deste trabalho foi a C2/00.

#### **4.2Resultados do estudo da morfologia das cepas**

Com o meio WLN observou-se que as seis cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* estudadas apresentavam a mesma morfologia lisa, além disso, as

seis cepas produziram ácido,clareando as placas que eram verdes inicialmente (viragem), como observado nas Figuras 4.2 e 4.3.

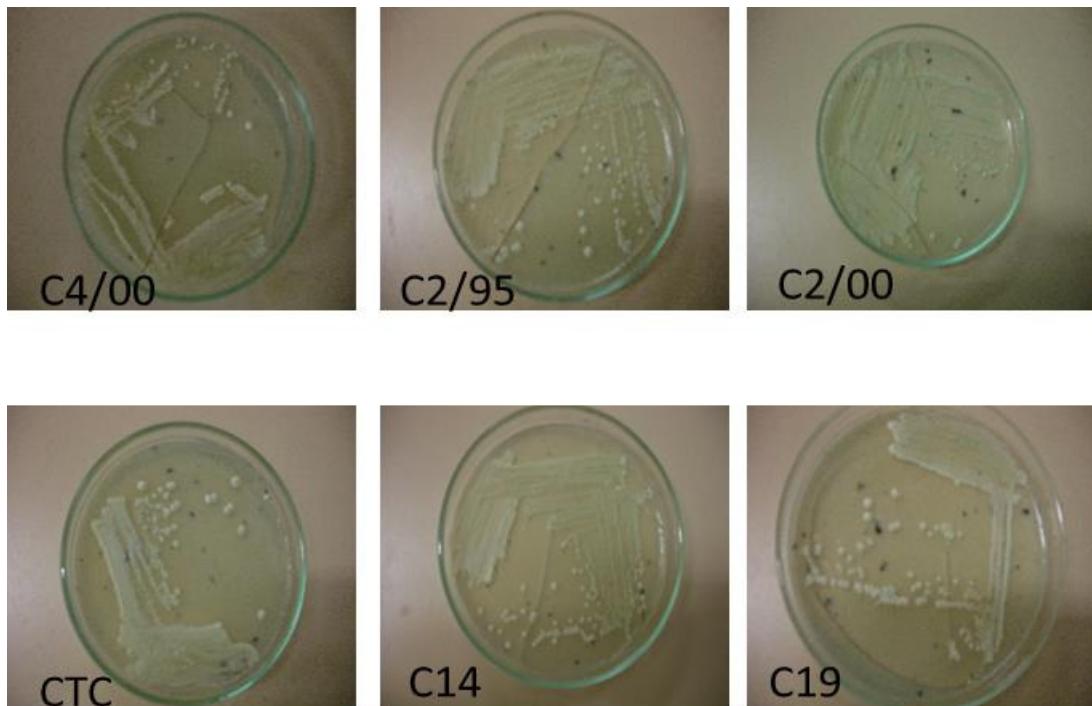


Figura 4.2 – Morfologia lisa das cepas estudadas.



Figura 4.3 – Morfologia lisa da cepa *Saccharomyces cerevisiae* C2/00.

A relação entre floculação e morfologia lisa ou rugosa ainda não é bem conhecida na literatura. O que se sabe é que a maioria das leveduras selvagens são de morfologia rugosa e estão associadas aos mecanismos de floculação e apresentam baixas capacidades fermentativas (REIS, 2011). No presente trabalho foi verificado que todas as cepas foram lisas e a cepa C2/00 apresentou excelente capacidade de floculação e boa capacidade fermentativa.

#### **4.3 Influência do pH no comportamento da cepa C2/00**

O pH exerceu grande influência no comportamento das células de *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, pois em valores na faixa de 4,5 à 6,0, as cepas se organizavam de forma mais uniforme, formando aglomerados cilíndricos perfeitos e o meio de cultivo se tornava transparente. Em valores entre pH 4,0 e 3,0 observava-se que as leveduras não se aglomeravam e se misturavam ao meio tornando-o viscoso e opaco, como pode ser observado na Figura 4.4. De acordo com Jin e Speers(2000), e Jin et al. (2001), provavelmente, a modificação dos valores de pH altera a ionização dos ácidos aminados das lectinas com a consequente mudança de sua conformação.

No trabalho de Souza e Mutton(2004), que estudou a indução da floculação de leveduras da fermentação alcoólica por bactérias *Lactobacillus fermentum*, é citado que uma redução brusca de pH promove a dispersão dos flocos, além de aumentar o tempo de sedimentação das células.

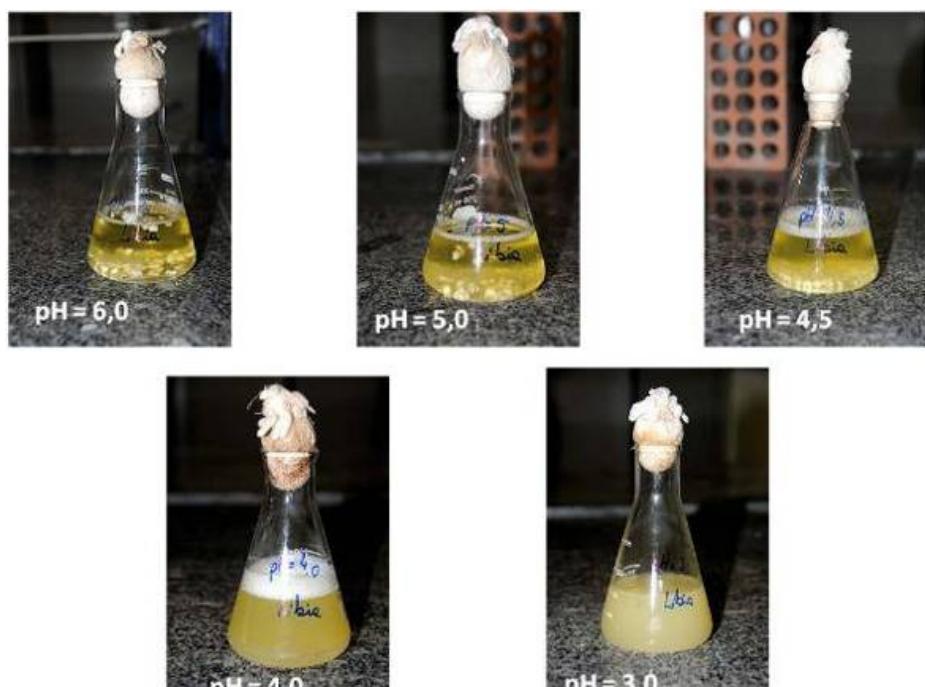


Figura 4.4 – Comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 de acordo com o pH.

Um comportamento interessante observado foi em meio de pH30 qual ocorreu uma desflocação total e quando foi aumentando o pH, ao atingir 4,5, as leveduras se aglomeraram e voltaram a formar flocos bem definidos, tornando o meio translúcido.

Segundo Soares, 2010, o pH pode exercer um efeito profundo na flocação das leveduras. Para várias cepas, a flocação ocorre num amplo intervalo de pH (2,5 – 9,0), embora para algumas cepas este intervalo seja muito mais estreito (2,5 – 5,5), porém para a maioria das cepas o pH ótimo para a flocação se situa entre 3,0 e 5,0.

O pH além de influenciar o comportamento floculante das cepas, ele interfere no rendimento em relação ao rendimento teórico e produtividade da fermentação alcoólica, como pode ser verificado nos resultados experimentais apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados da influência do pH no rendimento e produtividade na fermentação alcoólica para uma concentração inicial de ART de 189,5 g/L e tempo de fermentação 24 horas, experimentos realizados emshakera 32°C.

pH inicial	ART Residual (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade (g/L.h)
2,5	<b>106,05±3,2</b>	<b>3,18±0,1</b>	<b>27,22±1,3</b>	<b>63,83±5,5</b>	<b>2,722±0,13</b>
3,0	<b>58,45±2,4</b>	<b>2,55±0,3</b>	<b>50,77±2,1</b>	<b>75,83±4,5</b>	<b>5,077±0,21</b>
3,5	<b>46,98±1,9</b>	<b>2,71±0,2</b>	<b>63,98±2,0</b>	<b>87,87±3,9</b>	<b>6,398±0,2</b>
4,0	<b>50,09±2,1</b>	<b>2,89±0,2</b>	<b>65,49±1,0</b>	<b>91,95±2,8</b>	<b>6,549±0,1</b>
4,5	<b>32,35±1,7</b>	<b>1,45±0,1</b>	<b>75,42±0,8</b>	<b>93,94±2,0</b>	<b>7,542±0,08</b>
5,0	<b>26,05±0,8</b>	<b>1,85±0,3</b>	<b>69,3±1,8</b>	<b>82,97±2,56</b>	<b>6,93±0,18</b>
6,0	<b>21,64±1,1</b>	<b>2,19±0,1</b>	<b>67,76±2,2</b>	<b>78,99±3,08</b>	<b>6,776±0,22</b>

Os rendimentos e produtividades mais altos foram obtidos em pH 4 e 4,5, valores considerados ótimos na maioria das fermentações alcoólicas industriais. Em valores de pH abaixo de 4,0 observa um pequeno aumento na produção de glicerol, que é uma resposta ao estresse causado pelo baixo valor de pH. Verifica-se para baixos valores de pH uma baixa conversão de sacarose, o que implica em uma alta quantidade de açúcar residual.

#### 4.4 Influência da temperatura no comportamento da cepa C2/00

Os resultados experimentais obtidos emerlenmeyer revelaram que um aumento na temperatura implica numa redução do tamanho dos flocos da levedura, como pode ser visto na Figura 4.5. Além dos tamanhos dos flocos, a temperatura influenciou no rendimento e produtividade, conforme os resultados após 10 horas de fermentação apresentados na Tabela 4.3.

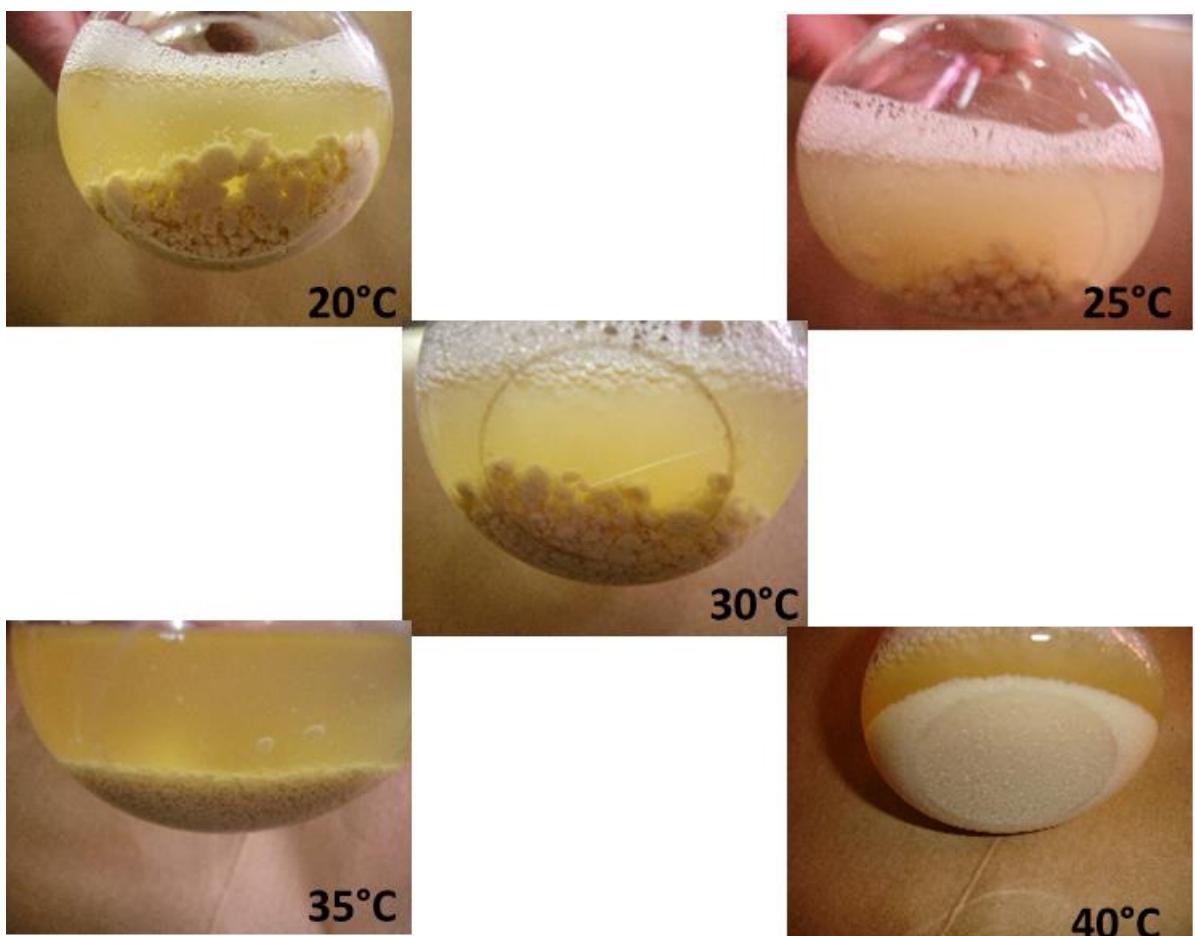


Figura 4.5 - Representação da influência da temperatura do tamanho dos flocos da cepa *Saccharomyces cerevisiae* C2/00.

Pela Figura 4.5 observa-se que com o aumento da temperatura houve uma diminuição dos tamanhos dos flocos, resultado este que está de acordo com os trabalhos de Soares et al., (1994) e Claro et al., (2007) que afirmaram que a incubação de leveduras na faixa de 35 a 37°C conduz a uma redução da floculação. Taylor e Orton, (1975) afirmaram que ocorre uma provável desnaturação das lectinas da floculação a altas temperaturas, assim se as leveduras floculantes permanecessem por alguns minutos numa temperatura entre 50 e 60°C promoveria a completa dispersão dos flocos, mas de forma reversível.

Tabela 4.3 - Resultados da influência da temperatura empregando a cepa C2/00, para uma concentração inicial de 168,42 g/L de ART, a pH 4,5, em 10 h de fermentação.

Temperatura(°C)	ART residual (g/L)	Álcool (g/L)	Rendimento (%)
20	38,73±1,9	44,5±1,9	67,15±3,8
25	23,42±0,9	53,44±2,7	72,12±4,1
30	8,21±0,5	71,05±3,2	86,79±4,2
32	5,32±0,2	76,23±3,9	91,46±4,8
35	0,69±0,03	77,26±3,8	90,14±4,4
40	2,53±0,11	66,11±3,3	77,99±3,9

Observa-se pelos resultados de concentração de açúcar residual e de álcool que a temperatura na qual se obteve os melhores resultados foi de 32°C, nesta temperatura observou-se que os flocos foram uniformes e de menor tamanho. Em temperaturas mais baixas a fermentação não é favorecida, restando mais açúcar no final da fermentação e a agregação celular foi maior resultando em flocos grandes, na ordem de 10 mm de diâmetro em média.

Os resultados desse estudo sobre a influência da temperatura indicou a faixa de temperatura de 30 a 35°C ser a mais indicada para o processo. Essa faixa é muito conhecida e utilizada nas fermentações alcoólicas com leveduras livres. Assim optou-se por utilizar a temperatura de 32°C para o trabalho subsequente.

#### 4.5 Influência da agitação na floculação de leveduras

Foi observado durante os testes preliminares utilizando a cepa *Saccharomyces cerevisiae* floculante C2/00 que a agitação influenciava no tamanho dos flocos. De acordo com Stratford(1992), é necessário um valor mínimo de agitação para ocorrer a floculação, pois a agitação mecânica permite aumentar a energia cinética das células o que supera a repulsão mútua entre elas. Sabendo que quanto maiores os flocos, menor é a superfície de contato das leveduras com o meio fermentativo, foi estudado três condições de agitação em *Shaker* para observar a diferença no tamanho dos flocos e a influência desse tamanho no resultado da fermentação alcoólica (GE et al., 2006).

Na Figura 4.6 e Tabela 4.4 são apresentados os resultados experimentais da influência da agitação na formação dos flocos e no rendimento da fermentação, respectivamente.

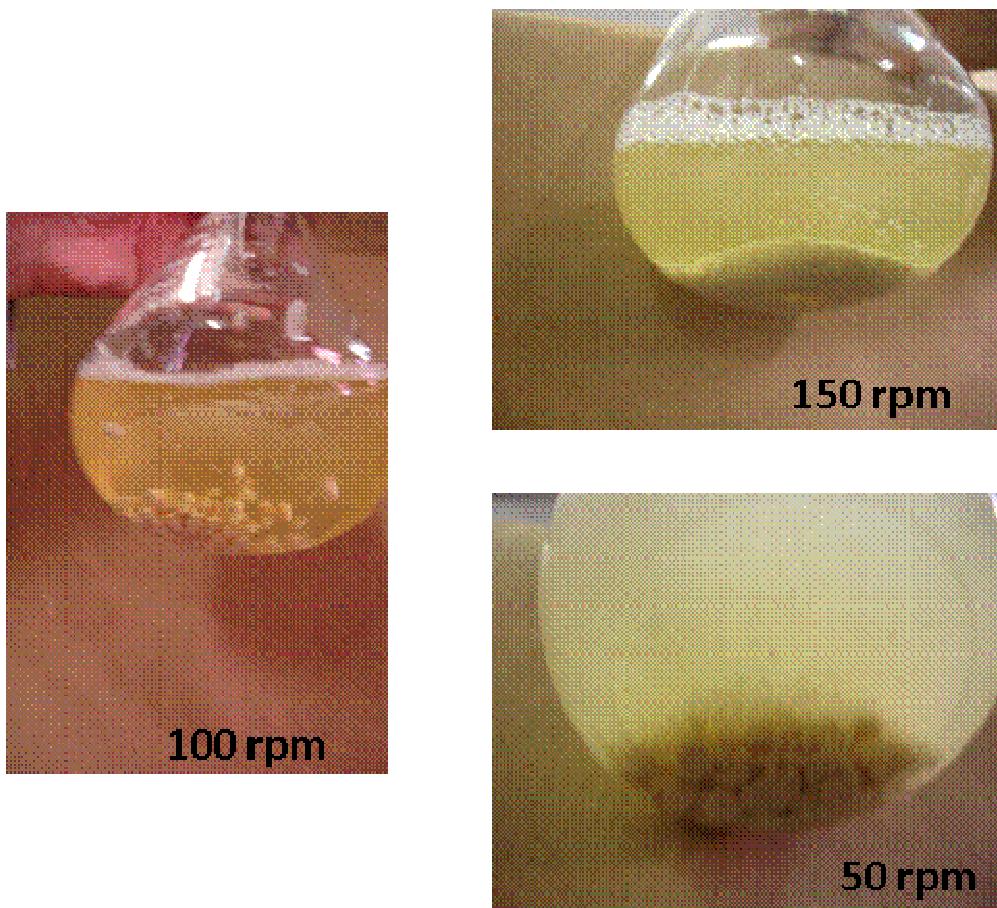


Figura 4.6: Influência da agitação na formação de flocos.

Tabela 4.4 - Resultados da influência da agitação na fermentação alcoólica em *shakera* pH 4,5 e concentração inicial 168,42 g/L de ART, a 32°C durante 15 h.

Agitação (rpm)	Tamanho dos flocos (diâmetro)	ART residual (g/L)	Álcool (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade (g/L.h)
50	$\pm 10$ mm	$4,56 \pm 0,07$	$68,96 \pm 1,6$	$82,35 \pm 2,2$	$4,59 \pm 0,11$
100	$\pm 5,69$ mm	$0,90 \pm 0,03$	$81,15 \pm 1,2$	$94,81 \pm 1,4$	$5,41 \pm 0,08$
150	$\pm 1$ mm	$0,92 \pm 0,02$	$82,26 \pm 1,3$	$96,11 \pm 1,5$	$5,48 \pm 0,09$

Com os resultados apresentados pode-se constatar que ocorreu um aumento do rendimento alcoólico com a diminuição do tamanho dos flocos. Na agitação de 150 rpm os flocos ficaram mais uniformes, de tamanho reduzido com 1 mm de diâmetro em média e isso

resultou no maior resultado obtido entre todos os testes realizados, na produção de 82,26 g/L de etanol e 96,11% de rendimento. Com uma menor agitação, 50 rpm, as células se agregaram formando flocos maiores de 10 mm de diâmetro em média e o rendimento da fermentação foi o de menor valor obtido igual a 82,35%.

#### **4.6 Estudos da velocidade de sedimentação das células**

Neste momento estudou-se a velocidade de sedimentação para futuramente projetar um decantador para o sistema que atendesse a separação de células do meio fermentado. Além disso, os decantadores deveriam manter as células decantadas para serem recirculadas, diminuindo a passagem de células do primeiro para o segundo reator e do segundo reator para o tanque de armazenamento final.

##### **4.6.1 Velocidade específica de sedimentação**

Os cálculos de velocidade específica de sedimentação baseado na absorbância medida em função do tempo até 4 minutos para as cepas estudadas foram:  $0,004 \text{ min}^{-1}$  para C19,  $0,005 \text{ min}^{-1}$  para C14,  $0,045 \text{ min}^{-1}$  para C2/95,  $0,178 \text{ min}^{-1}$  para C2/00,  $0,113 \text{ min}^{-1}$  para CTC e  $0,196 \text{ min}^{-1}$  para C4/00.

Estes resultados foram próximos dos valores encontrados nos estudos de cepas de características floculantes isoladas de usinas do trabalho de Viegas, (2003). A velocidade específica de sedimentação da cepa C2/00 é próxima daquela da levedura isolada da safra de 1999 da Usina Costa Pinto por Viegas, (2003) que foi  $0,16 \text{ min}^{-1}$  e menor que da isolada da Usina Junqueira da safra 2000, de  $0,26 \text{ min}^{-1}$ , todas obtidas pelo mesmo procedimento experimental.

##### **4.6.2 Influência do pH na velocidade de sedimentação**

As velocidades específicas de sedimentação (VES) para cada valor de pH estudado foram obtidas com a leitura da absorbância com o tempo. Após 4 minutos o perfil de sedimentação das células se manteve constante para todos os valores de pH, por isso o cálculo foi realizado no tempo igual a 4 minutos. Na Tabela 4.5 estão apresentados os valores calculados de velocidade específica de sedimentação para cada pH estudado.

Tabela 4.5 - Velocidade específica de sedimentação em diferentes valores de pH para a cepa da levedura C2/00

pH	VES ( $\text{min}^{-1}$ )
3	<b>0,086±0,004</b>
4	<b>0,144±0,004</b>
5	<b>0,240±0,012</b>
6	<b>0,178±0,003</b>
7	<b>0,141±0,001</b>

Analisando a Tabela 4.5, pode-se perceber que a maior velocidade de sedimentação,  $0,240 \text{ min}^{-1}$ , foi obtida no pH 5. Já para valores de pH menores que 5 houve uma queda expressiva na velocidade de sedimentação, resultado este esperado pelo estudo realizado anteriormente da influência do pH no item 4.3 que mostrou desfloculação da levedura em baixos valores de pH, se misturando ao meio e dificultando o processo de sedimentação.

O pH final observado na fermentação alcoólica para a levedura C2/00 foi em torno de  $4 \pm 0,2$ . 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 4.7 estão apresentados os valores de  $\text{Abs}/\text{Abs}_0$  em função do tempo para a levedura C2/00 em diferentes valores de pH. Pela Figura 4.7 fica evidente a maior velocidade de sedimentação para o pH 5.

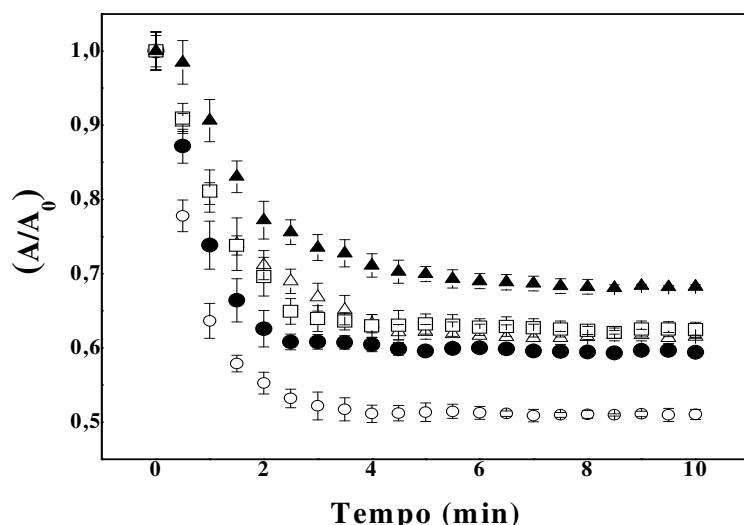


Figura 4.7 – Perfis de sedimentação em pH 3 (▲), pH4 (□), pH5 (○), pH6 (●) e pH 7 (Δ) em função do tempo

#### 4.6.3 Velocidade de sedimentação no teste de proveta

Os resultados de velocidade de sedimentação em proveta foram determinados em pH 5,0 por ter sido o melhor resultado de velocidade específica de sedimentação. Os resultados foram ajustados ao modelo exponencial, Equação 4.1, que descreve a variação da posição da interface de sedimentação com o tempo para o cálculo da velocidade média de sedimentação. O perfil de velocidade foi calculado a partir da derivada da Equação 4.1 com o tempo e é descrito pela Equação 4.2.

$$Y = a + b \cdot \exp\left(\frac{-x}{c}\right) \quad (4.1)$$

$$v = -\frac{b}{c} \cdot \exp\left(\frac{-x}{c}\right) \quad (4.2)$$

Sendo,

$Y$  = Posição da partícula em um tempo  $t$  (cm);

$v$  = velocidade de sedimentação (cm/min);

$a, b, c$  = parâmetros da equação.

Os dados experimentais tiveram 99% da sua variabilidade explicada pela equação proposta, cujo coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,99. Os perfis de velocidade de sedimentação para o teste em proveta, perfil de posição da interface e o perfil do modelo proposto em função do tempo estão apresentados na Figura 4.8.

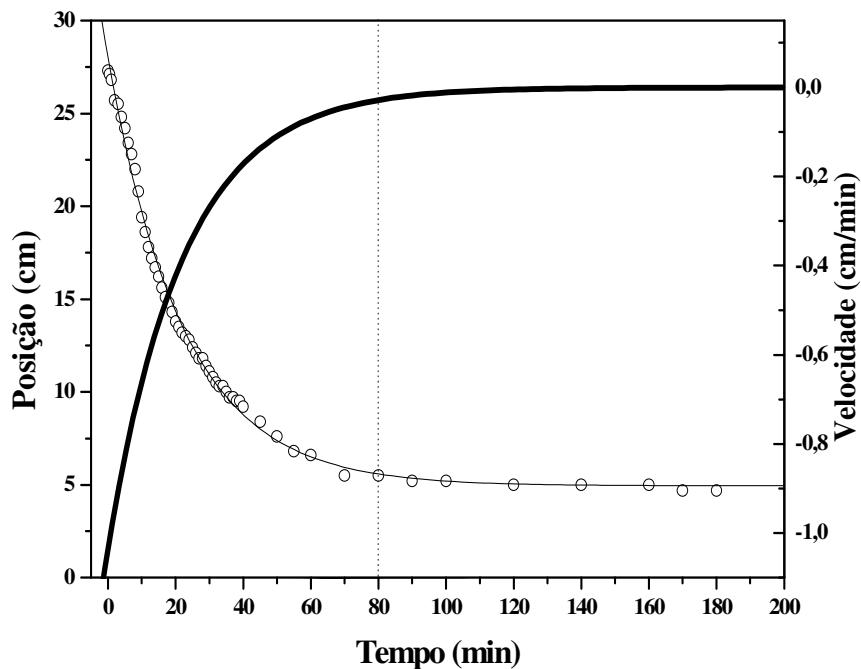


Figura 4.8 – Perfil do modelo da velocidade de sedimentação para o teste em proveta (—), perfil de posição do micro-organismo (○) e o perfil do modelo proposto (—) em função do tempo

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

#### 4.7 Estudo da fermentação em batelada utilizando um reator tipo torre

Este estudo foi realizado empregando um reator torre, cuja corrente de saída foi direcionada a um frasco coletor, do qual foi retirada a corrente de reciclo, conforme Figura 4.9. A concentração inicial de sacarose foi de 160 g/L e o pH inicial foi 4,5. Nas duas vazões de recirculação utilizadas neste estudo, 6 mL/s e 30 mL/s, o meio fermentativo não apresentou diferenças significativas nas concentrações de ART e etanol obtidas nos três pontos analisados do reator (fundo F, meio M e topo T), como ilustrado na Figura 4.9. Assim, o processo foi analisado apenas em função das concentrações de substrato e produto na saída do reator.

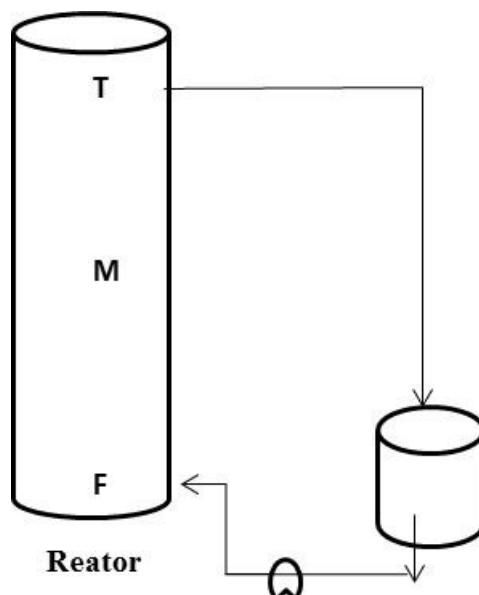


Figura 4.9 - Esquema de um reator torre trabalhando em batelada.

Na Figura 4.10 são apresentados os resultados obtidos na fermentação com a vazão de reciclo igual a 6 mL/s. Verifica-se que em 13,5 horas de fermentação a sacarose não tinha chegado ao fim. A produção de etanol alcançou o valor de 66,39 g/L e um rendimento de 82,27% em relação ao teórico. O pH no final das fermentações na condição de 6 mL/s foi em torno de 3,7.

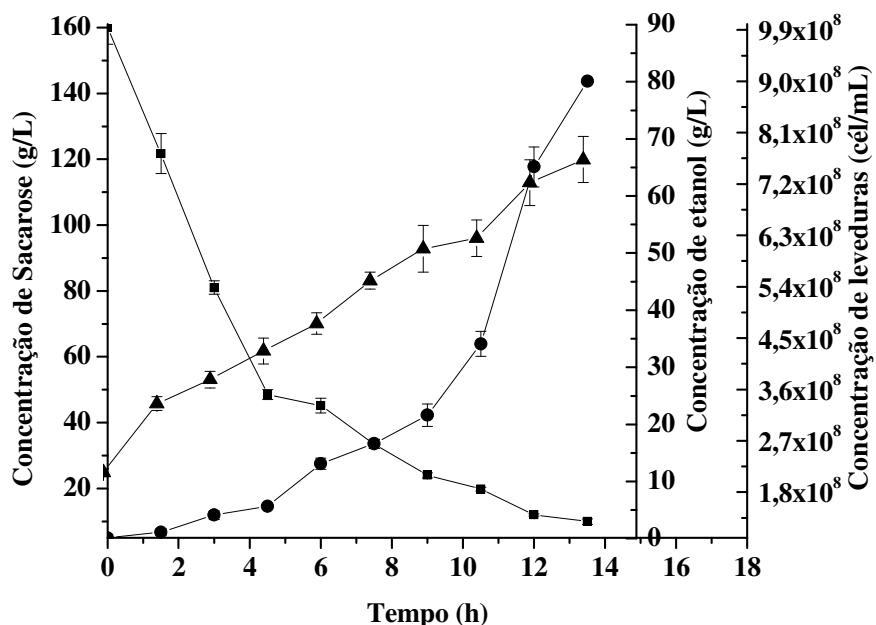


Figura 4.10 – Perfis cinéticos relativos ao consumo de sacarose (■), concentração celular (●) e produção de etanol (▲) com vazão de 6 mL/s.

Na Figura 4.11, relativa à fermentação com a vazão de reciclo de 6 mL/s, pode ser observada a formação de flocos grandes decantados no fundo do reator.



Figura 4.11 – Reator torre em batelada com uma vazão de recirculação de 6 mL/s.

Na Figura 4.12 são apresentados os resultados obtidos na fermentação com a vazão de reciclo igual a 30 mL/s, onde verifica-se o consumo total de sacarose em 11 horas de fermentação, não havendo crescimento celular significativo. Com a vazão de 30 mL/s a produção de etanol obtida foi de 74,8 g/L, atingindo um rendimento de 86,9%.

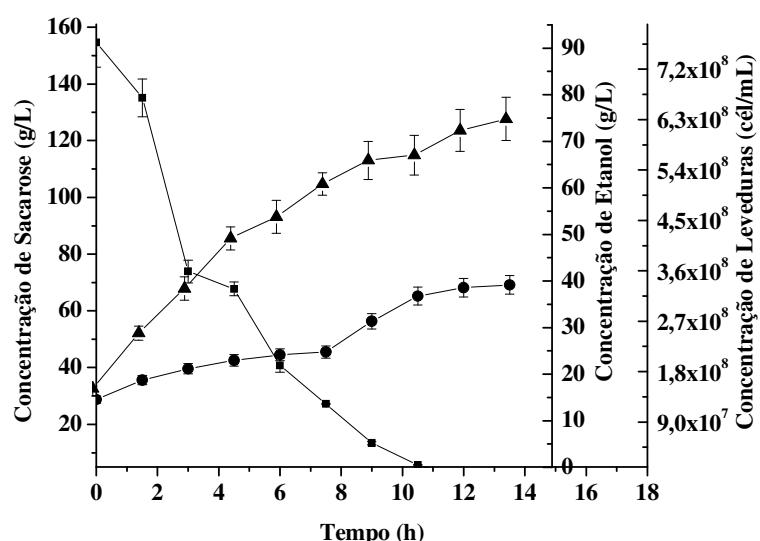


Figura 4.12 – Perfis cinéticos relativos ao consumo de sacarose (■), concentração celular (●) e produção de etanol (▲) com vazão de 30 mL/s.

Na Figura 4.13 observa que o sistema como um todo está bem homogeneizado, sendo que ao utilizar uma alta vazão de recirculação, os tamanhos dos flocos diminuíram e ocuparam todo o volume do reator. O pH final das fermentações com vazão de reciclo de 30 mL/s foi em torno de 3,5.



Figura 4.13 – Reator torre em batelada com uma vazão de recirculação de 30 mL/s.

Nos processos fermentativos com taxa de recirculação de 6 mL/s e 30 mL/s, verifica-se que em uma vazão menor a sacarose não foi totalmente consumida no período de 13,5 h. Na fermentação com vazão maior, por estar mais agitado, verificou-se o consumo total de sacarose em menor tempo de fermentação e praticamente não ocorreu crescimento celular. Como o açúcar foi consumido mais rapidamente, isso implica em uma maior produtividade igual a 6,87 g/L.h para a vazão de 30 mL/s e de 5,96 g/L.h para a vazão de 6 mL/s.

Pacheco(2010), estudou a fermentação alcoólica empregando outra cepa de *Saccharomyces cerevisiae* efloculante em batelada, com recirculação de células, no mesmo reator torre em que foram realizados os experimentos de vazão de reciclo 6 e 30 mL/s do presente trabalho. O melhor resultado obtido por Pacheco, (2010), no planejamento composto central no qual foi estudada a influência conjunta da concentração de inóculo, concentração inicial de sacarose e vazão de reciclo foi obtida para a vazão de recirculação igual a 9,9 mL/s.

#### **4.8Efeito do uso de antibióticos para controlar contaminação em fermentação com a cepa C2/00**

As fermentações realizadas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 em processo batelada a  $32 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  em reator de mistura, com 10% (v/v) de decantado celular como inóculo, sem contaminação induzida, alcançou rendimentos altos de 92%. A concentração inicial de sacarose foi de 160 g/L e foi totalmente consumida em 10 horas de fermentação, com produtividade de 7,84 g/L.h. As concentrações de etanol, ART e células de bactérias e leveduras estão apresentadas na Figura 4.14.

A fermentação com o inóculo de levedura contaminada com caldo de cana numa concentração de  $10^{10}$  células/mL, ocorreu conforme a Figura 4.15. Pode observar que a concentração de etanol obtida foi bem menor que quando não foi acrescentada a contaminação e a maior concentração obtida foi de 48,56 g/L de etanol, enquanto sem contaminação chegou a 78,44 g/L de etanol. Assim houve a necessidade de controlar essa contaminação para melhorar o rendimento e produtividade da fermentação alcoólica.

Inicialmente foram realizados testes utilizando o antibiótico comercial Kamoran na concentração indicada pelo fabricante, 3ppm, o resultado desse estudo está apresentado na Figura 4.16. O uso desse antibiótico, muito comum nas fermentações industriais com células livres, mostrou ser eficiente também no controle da contaminação utilizando leveduras floculantes, obtendo um rendimento de 83%.

Foram testadas também as concentrações de 1 e 6 ppm de Kamoran. Com a concentração de 1ppm o rendimento obtido foi muito baixo ficando em 67,42% e na concentração de 6 ppm (Figura 4.17) o rendimento aumentou para 89,5 % em 10 horas de fermentação e o açúcar residual de 1,45 g/L (ART) foi menor do que obtido na fermentação de 3 ppm de 21,31 g/L de ART (Figura 4.16). O rendimento da fermentação alcoólica empregando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* não floculante obtido por Leite et al., (2012) foi de 83,1%, iniciando a fermentação com uma concentração inicial de bactérias igual a  $8,7 \cdot 10^8$  células/mL e com 6 ppm de Kamoran, durante 9 horas de fermentação. Nas concentrações de 3 ppm e 6 ppm o número de bactérias foram reduzidos a ordem de  $10^5$  células/mL e as leveduras finalizaram as fermentações com  $10^8$  células/mL.

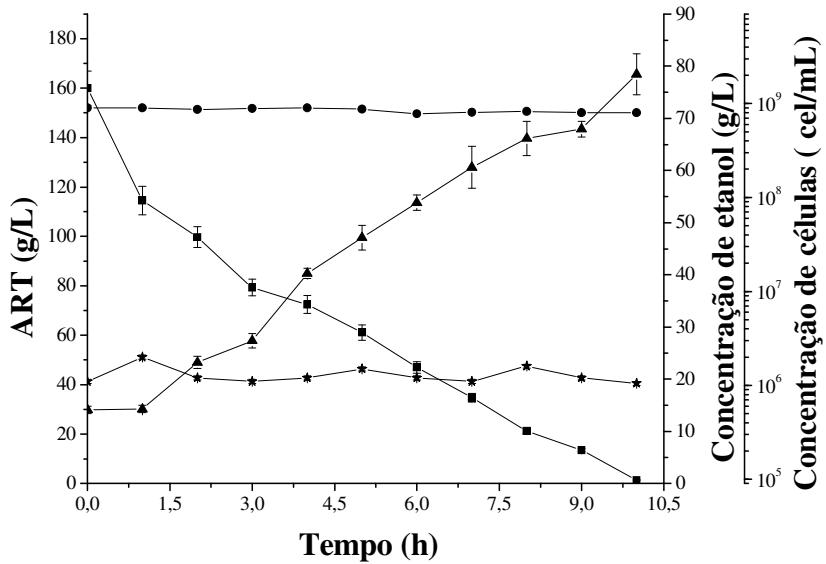


Figura 4.14 - Fermentação com 160 g/L de sacarose sem contaminação induzida. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(\*) e produção de etanol (▲).

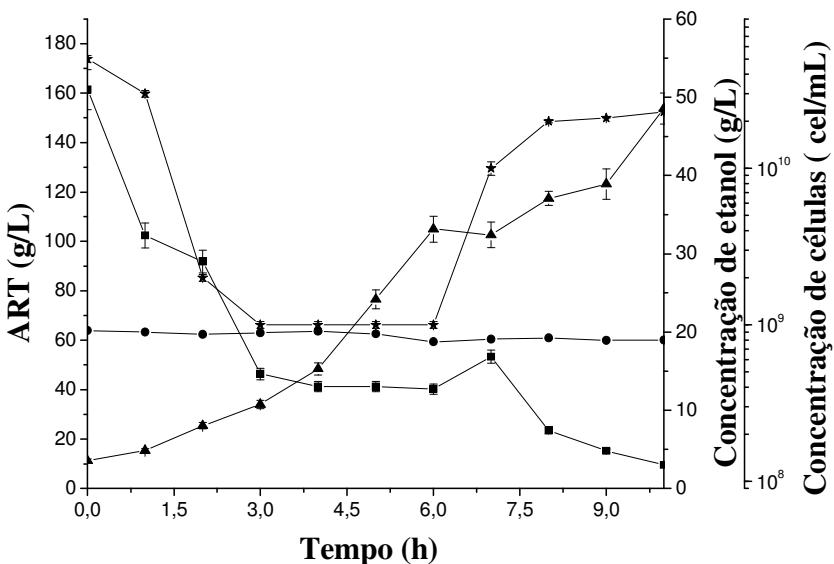


Figura 4.15 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação induzida. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(\*) e produção de etanol (▲).

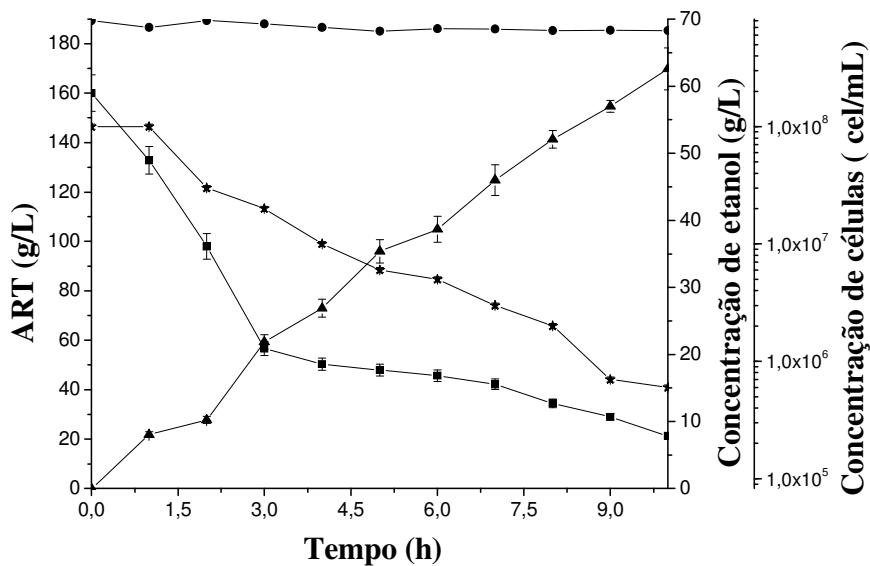


Figura 4.16 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 3 ppm de Kamoran.  
Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(※) e produção de etanol (▲).

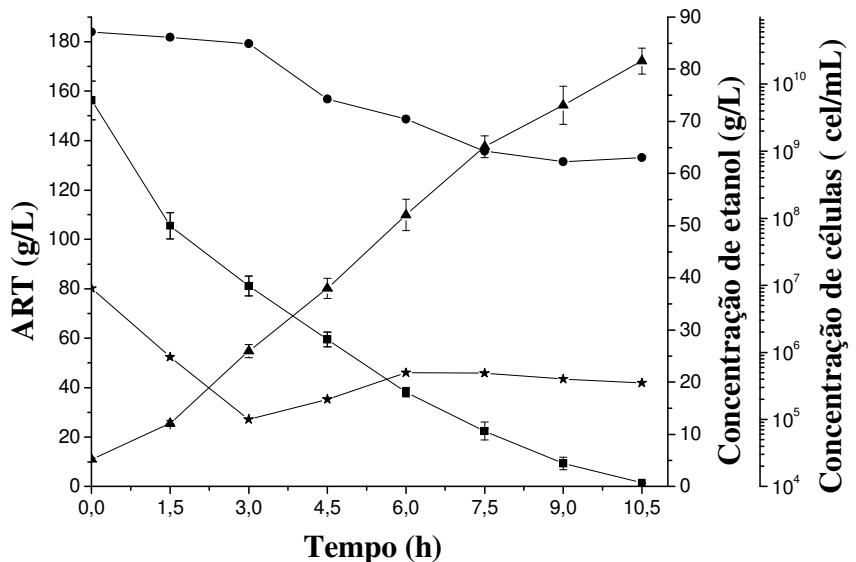


Figura 4.17 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 6 ppm de Kamoran.  
Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(※) e produção de etanol (▲).

No intuito de testar a eficiência de um antibiótico natural nas fermentações com leveduras floculantes, foi utilizado o Beta Bio na concentração de 20 ppm, concentração esta, recomendada pelo fabricante. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições do estudo com Kamoram, com a mesma contaminação. Nestas condições, em 10,5 h de fermentação ainda restava 8,56 g/L de ART e obteve apenas 56,27 g/L de etanol, resultando em um rendimento de 68,9%. Assim, realizou-se um teste com concentração de 35 ppm e o rendimento subiu para 88%. As concentrações em função do tempo para esta fermentação são apresentados na Figura 4.18. Na tentativa de aumentar esse rendimento testou-se a concentração de Beta Bio de 45 ppm, mas não houve um aumento significativo de rendimento permanecendo na ordem de 88%. A redução do número de bactérias utilizando o antibiótico natural foi menor se comparada à utilização do Kamoran, sendo que, com Beta Bio no final da fermentação ainda restava uma contaminação da ordem de  $10^8$  células/mL de bactérias e os rendimentos obtidos utilizando os dois antibióticos foram muito próximos. O melhor resultado obtido no trabalho de Leite et al.(2012), que avaliou a produção de etanol com leveduras livres, foi utilizando Beta Bio na concentração de 46 ppm, que alcançou um rendimento de 81,4% e uma redução do número de bactérias para mesma ordem de grandeza daquela alcançada no presente trabalho com leveduras floculantes.

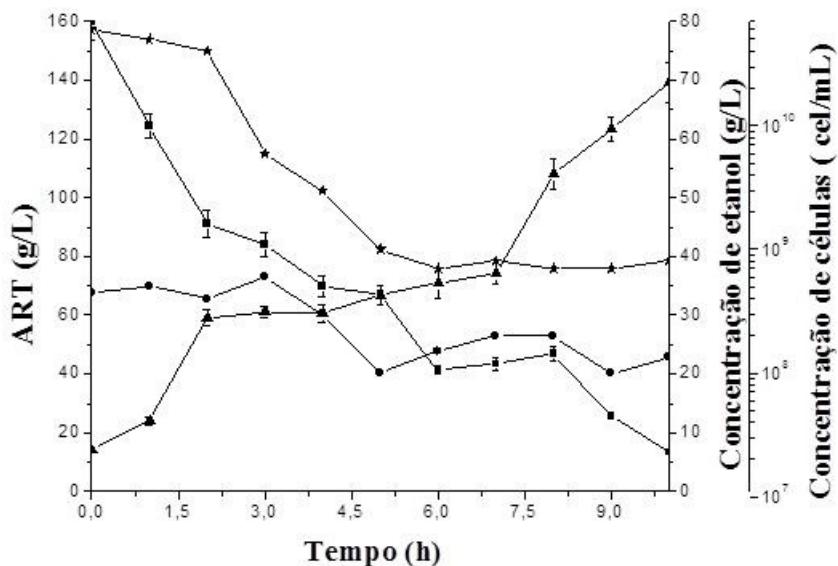


Figura 4.18 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 35 ppm de Beta-Bio. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(✖) e produção de etanol (▲).

Foram testados, também, dois antibióticos comerciais muito utilizados para controlar contaminação de bactérias em fermentações alcoólicas, ampicilina e ácido nalidíxico, na concentração de 50 ppm, recomendada pelos fabricantes. Os resultados obtidos utilizando esses dois antibióticos foram muito próximos um do outro como pode ser observado nas Figuras 4.19 e 4.20, para ampicilina e ácido nalidíxico, respectivamente. Com os dois antibióticos os rendimentos obtidos foram de 91% e a redução das bactérias foi na ordem de  $10^7$  células/mL.

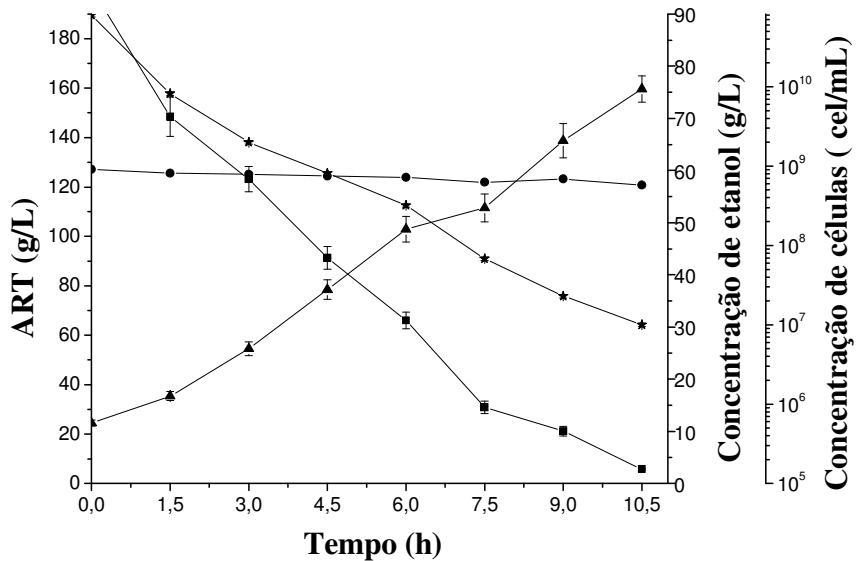


Figura 4.19 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 50 ppm de Ampicilina. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(✖) e produção de etanol (▲).

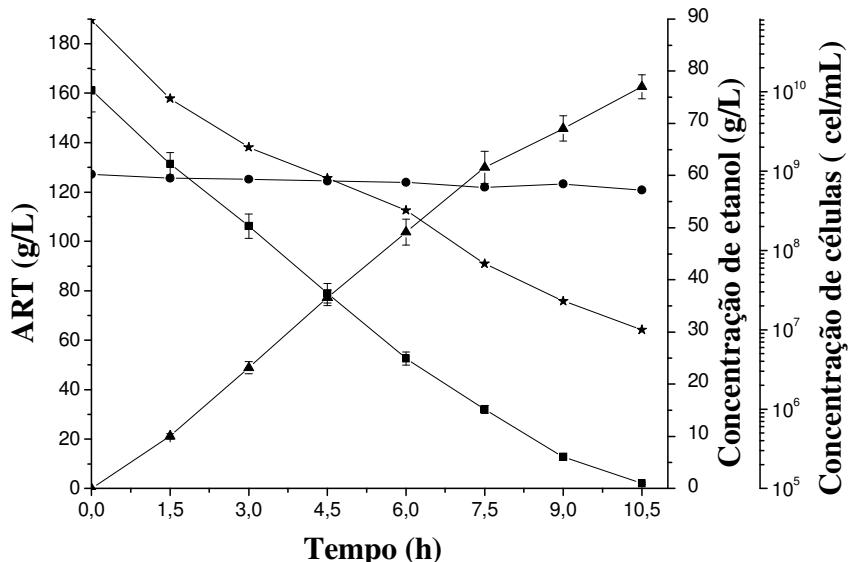


Figura 4.20 – Fermentação com 160 g/L de sacarose com contaminação e 50 ppm de Ácido nalidíxico. Com concentração de ART (■), concentração leveduras (●), concentração de bactérias(✖) e produção de etanol (▲).

Na Tabela 4.6 estão os resultados da influencia do uso de antibióticos na concentração de etanol, no rendimento e na redução do número de bactérias em cada processo fermentativo estudado.

Tabela 4.6 – Resultados da influencia do uso de antibióticos na fermentação alcoólica com células floculantes em reação batelada.

Antibióticos	Concentração (ppm)	Etanol (g/L)	Rendimento %	Redução bacteriana (UFC/mL)
<b>Sem indução</b>	<b>0</b>	<b>78,44</b>	<b>92%</b>	<b>0,00E+00</b>
<b>Contaminada</b>	<b>0</b>	<b>48,55</b>	<b>60%</b>	<b>0,00E-00</b>
<b>Kamoran</b>	<b>1 ppm</b>	<b>56,26</b>	<b>67,42%</b>	<b>0,00E+00</b>
<b>Kamoran</b>	<b>3 ppm</b>	<b>62,58</b>	<b>83%</b>	<b>1,00E+02</b>
<b>Kamoran</b>	<b>6 ppm</b>	<b>81,57</b>	<b>89,50%</b>	<b>1,00E+01</b>
<b>Beta Bio</b>	<b>20 ppm</b>	<b>56,26</b>	<b>68,9%</b>	<b>1,00E+02</b>
<b>Beta Bio</b>	<b>35 ppm</b>	<b>69,54</b>	<b>88%</b>	<b>1,00E+02</b>
<b>Beta Bio</b>	<b>45 ppm</b>	<b>72,38</b>	<b>86%</b>	<b>1,00E+02</b>
<b>Ampicilina</b>	<b>50 ppm</b>	<b>75,65</b>	<b>91%</b>	<b>1,00E+02</b>
<b>Ácido Nalidixico</b>	<b>50 ppm</b>	<b>77</b>	<b>91%</b>	<b>1,00E+02</b>

Os rendimentos obtidos pelas fermentações alcoólicas com contaminação induzida utilizando células floculantes foram promissores se comparado com o trabalho de Leite et al., (2012) que estudou a influência dos dois antibióticos estudados (Kamoran e Beta Bio) no controle da contaminação da fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* livre. Pode constatar que o rendimento alcançado com leveduras floculantes foi maior do que com leveduras livres, mas a diminuição da concentração de bactérias e leveduras no trabalho de Leite et al.(2012),alcançou, com os dois antibióticos estudados nos dois trabalhos, a concentrações da ordem de  $10^5$  células/mL. Acredita-se que no presente trabalho, com leveduras floculantes, os antibióticos apresentaram ações bacteriostáticas ao invés de bactericidas, como esperado, apenas inibiu as bactérias durante o processo fermentativo. O controle da contaminação bacteriana empregando leveduras sem características floculantes é mais fácil, uma vez que os flocos formados pelas leveduras floculantes retêm as bactérias no seu interior, dificultando a ação do antibiótico. Este efeito é semelhante ao verificado industrialmente em fermentações alcoólicas com leveduras não floculantes, que devido à contaminação bacteriana, ocorre

flocação, dificultando a operação de centrifugação do vinho fermentado. Um dos possíveis processos a serem utilizados para diminuir a contaminação seria o tratamento com ácidos que ao diminuir o pH ocorre a desflocação da célula e o contato do antibiótico com as bactérias seria mais eficiente.

#### **4.9 Testes para definir as condições de processo do sistema de reatores torre em série**

A partir deste ponto iniciaram-se os estudos com dois fermentadores torres ligados em série para a condução das fermentações contínuas utilizando a cepa C2/00 de *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente foram encontradas muitas dificuldades na operação do sistema, assim serão descritos detalhadamente os testes realizados em sequência para permitir que o processo em escala de laboratório funcionasse de maneira satisfatória. Todos os resultados apresentados foram obtidos após o sistema entrar em estado estacionário.

##### **4.9.1 Período de adaptação**

Durante o processo de adaptação dos micro-organismos aos reatores, cada reator foi alimentado individualmente com meio de cultura numa concentração inicial de 125 g/L de sacarose e com 800 mL de inóculo na concentração de  $10^5$  células/mL. Nesse processo que durou 60 horas percebeu-se um aumento da altura do leito concentrado de células com o tempo, atingindo uma concentração celular de  $10^7$  células/mL.

De acordo com Soares e Mota(1997), a presença de um baixo número de células por mililitro limita a possibilidade física de estabelecimento de uma ligação de flocação e a taxa de agregação é praticamente zero. Nas concentrações acima de  $4.10^7$  células/mL o número de células remanescente em suspensão é constante e independente da concentração inicial celular (SOARES e MOTA, 1997).

Outro ponto importante observado foi a influência do pH do meio de entrada, o qual determinava o comportamento das células em relação à flocação no interior do reator. Mantendo-se o pH de entrada igual a 4,5, não se observou uma boa fluidização dos flocos. Já com o pH inicial 6,0 do meio de alimentação, houve um aumento da fluidização e a formação de flocos bem definidos, conforme a Figura 4.21. De acordo com os testes do item 4.3 os melhores valores para a flocação eram os maiores que 4,5, mas durante o processo de fermentação ocorre uma diminuição do seu valor.



Figura 4.21 – Comportamento dos leitos de célula nos reatores torres com pH do meio de alimentação igual a 6.

A cepa C2/00 possui um comportamento floculante muito interessante, ocorrendo a formação de flocos visualmente perceptíveis, que se fluidizam na presença de açúcar em decorrência do desprendimento do CO<sub>2</sub> pela fermentação e com a redução dos açúcares fermentescíveis as células decantam rapidamente se agrupando no fundo do reator (ANDRIETTA et al., 2008; SOARES, 2010).

#### **4.9.2 Fermentação contínua em série, tempos de residência de 12 e 17 horas e concentração de alimentação 180 g/L de sacarose a pH 6,0**

Após as 60 horas de adaptação celular iniciou-se a operação em processo contínuo, onde os dois reatores trabalhavam em série. O meio de alimentação consistiu de uma solução de sacarose de concentração 180 g/L a pH 6,0. O pH 6,0, apesar de não ser o melhor para o rendimento da fermentação alcoólica, tem-se os flocos definidos e como durante o processo ocorre queda no valor do pH, foi uma tentativa de não deixar cair muito este valor. Foram realizados experimentos com tempos de residência total de 12 e 17 horas, sem reciclo. Observou-se um aumento significativo da fluidização e da altura do leito concentrado de células no primeiro reator. A altura do leito teve influência direta da concentração inicial de sacarose e da produção de CO<sub>2</sub> pela fermentação alcoólica, observado nos experimentos subsequentes. O pH dos produtos que saiam do reator 2 eram na ordem de 3,6. Ao atingir o estado estacionário as concentrações de açúcar redutor, etanol, glicerol e concentração celular nos pontos de A a G da Figura 4.22, são mostradas nas Tabelas 4.7 e 4.8.

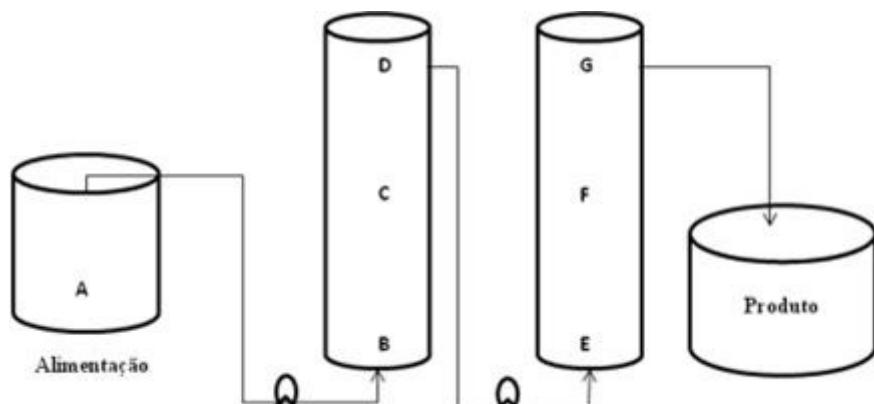


Figura 4.22 - Esquema dos ensaios experimentais preliminares.

Tabela 4.7 – Resultados de açúcar redutor, concentração celular, concentração de etanol e glicerol (g/L), obtidos através dos experimentos com tempo de residência de 17 horas.

Pontos	Leveduras (cél/mL)	ART (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
A	0,00E+00	179,38	0,00	5,67
B	1,25E+08	51,56	0,93	40,92
C	7,50E+07	51,75	0,85	43,29
D	7,50E+07	50,97	0,92	44,87
E	2,15E+08	25,80	2,05	68,16
F	1,00E+07	18,76	1,90	76,13
G	3,50E+07	16,73	1,94	78,61

Tabela 4.8 – Resultados de açúcar redutor, concentração celular, concentração de etanol e glicerol (g/L), obtidos através dos experimentos com tempo de residência de 12 horas.

<b>Pontos</b>	<b>Leveduras</b> (cél/mL)	<b>ART</b> (g/L)	<b>Glicerol</b> (g/L)	<b>Etanol</b> (g/L)
<b>A</b>	<b>0,00E+00</b>	<b>179,89</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>B</b>	<b>1,45E+08</b>	<b>86,82</b>	<b>1,68</b>	<b>42,14</b>
<b>C</b>	<b>5,50E+07</b>	<b>81,47</b>	<b>1,64</b>	<b>39,64</b>
<b>D</b>	<b>3,50E+07</b>	<b>82,54</b>	<b>1,65</b>	<b>41,45</b>
<b>E</b>	<b>1,60E+08</b>	<b>43,64</b>	<b>1,96</b>	<b>60,32</b>
<b>F</b>	<b>1,00E+08</b>	<b>40,77</b>	<b>1,95</b>	<b>60,14</b>
<b>G</b>	<b>4,00E+07</b>	<b>43,34</b>	<b>2,13</b>	<b>64,31</b>

A produtividade alcançada foi de 4,62 g/L.h e 5,36 g/L.h e os rendimentos foram 89,03% e 86,09% para os tempos de residência de 17 e 12 horas, respectivamente. Estes valores de rendimentos foram maiores se comparados com o processo do trabalho de Andrietta et al, (2008), que alcançou um rendimento de 83,53%, no qual utilizaram um sistema de reatores torre em série com *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes, com tempo de residência de 7,5 h.

Com o aumento da vazão houve um maior arraste de células do primeiro para o segundo reator, o que pode ter ocasionado a diminuição do consumo de açúcares no primeiro reator e um pequeno aumento na altura do leito concentrado de células no segundo reator. De acordo com Viegas (2003), há uma relação entre a concentração de ART na alimentação e a concentração dos flocos de leveduras na saída do sistema, uma vez que o aumento da concentração de açúcar na alimentação aumenta a viscosidade do meio fermentativo, aumentando assim o carregamento hidráulico dos flocos de células.

Pode se observar que a concentração celular é maior nos pontos B e E que atingem a ordem de  $10^8$  células/mL, resultado este observado pela altura do leitona base dos reatores.

#### **4.9.3 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0, tempo de residência de 10 horas e 125 g/L de sacarose na alimentação do sistema**

Neste experimento a concentração de sacarose na entrada do processofoi 125 g/L, o pH foi igual a 6 e diminuiu-se o tempo de residência para 10 horas no conjunto de reatores. Neste teste pôde-seobservar que a altura do leito de decantado celular do Reator 1 alcançou 20 cm e as células no Reator 2 decantaram na base sem muita agitação.

A partir deste momento as respostas foram analisadas apenas na saída do Reator 1 e do Reator 2, por entender que estes pontos foram os mais relevantes para o estudo. A produção total de etanol foi de 37,8 g/L, o rendimento de 33,41% e a produtividade de 3,78 g/L.h. O açúcar residual que saia do Reator 1 para o Reator 2 era de 24,04 g/L, sendo consumido apenas 5,61 g deste açúcar no segundo reator. Concluiu-se que nesta concentração de sacarose e neste tempo de residência apenas o Reator 1 funcionou. O pH da saída do reator 2 foi de 3,73.

#### **4.9.4 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0 e tempo de residência de 10 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema**

Com o aumento da concentração de sacarose na vazão de alimentação, a altura do leito concentrado de células no Reator 1 alcançou 40 cm com um pouco mais de fluidização em comparação às fermentações anteriores, e a altura do leito no Reator 2 aumentou em 30%, mas o seu leito de células ainda não fluidizava. O pH de saída do Reator 1 e entrada do Reator 2 foi de 4,7, considerado ainda um bom pH para fermentação, mas a quantidade de açúcar na entrada do Reator 2 continuou baixa, igual a 20,87 g/L. Nestas condições o rendimento total alcançado foi de 61,33% e 2,087 g/L.h de produtividade. O pH encontrado na saída do Reator 2 foi de 3,78.

#### **4.9.5 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0, tempo de residência de 6 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema**

Ao diminuir o tempo de residência nos reatores, a quantidade de sacarose alimentada por unidade de tempo no sistema aumentou e provocou a movimentação dos flocos nos dois reatores, como consequênciada liberação de CO<sub>2</sub> decorrente da fermentação. Este tempo de

residência foi próximo daquele utilizado por Viegas, (2003), sendo 3,75 h em cada reator torre ligados em série.

A altura do leito de células no Reator 1 alcançou 55 cm e no segundo 33 cm. O rendimento total obtido foi de 68,63% e 9,38 g/L.h de produtividade. A concentração de açúcar redutor na entrada do Reator 2 ainda foi baixa de 41,33 g/L e o pH na entrada do segundo reator foi de 4,2.

Neste momento foi acrescentado 200 g de decantado de células nos dois reatores e realizados os demais testes preliminares. Realizando o experimento anterior com a nova quantidade de células nos reatores, o rendimento não melhorou significativamente, atingindo 71,75% e 10,35 g/L.h de produtividade. Os dois reatores continuaram agitados, com flocos em mistura atingindo toda extensão do reator.

#### **4.9.6 Fermentação contínua em série com pH inicial 6,0, tempo de residência de 6 horas, 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema e 3g/L de extrato de levedura**

Neste experimento reduziu-se a concentração de extrato de levedura de 6 g/L para 3 g/L, por se tratar de um nutriente de alto custo. Essa redução influenciou no comportamento da fermentação e após 24 horas de processo contínuo, verificou-se visualmente um decréscimo na liberação de CO<sub>2</sub>, diminuição da fluidização, empacotamento do leito e consequentemente, diminuição do rendimento para 66,51% e da produtividade para 9,67 g/L.h.

A partir desses resultados optou-se pela manutenção da concentração de extrato de levedura em 6 g/L até o final do trabalho. Com a finalidade de melhorar o rendimento do processo fermentativo, optou-se por diminuir o pH do meio de alimentação para 5,0, valor utilizado nos trabalhos de Andrietta et. al, (2008) e Viegas, (2003), valor este, mais próximo ao pH ótimo para fermentação desta levedura.

#### **4.9.7 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 6 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema**

Com a modificação do pH na alimentação do sistema para 5,0, a fermentação no primeiro reator aumentou consideravelmente resultando em maior valor de rendimento total o qual atingiu 86,96% e a produtividade alcançou 11,82 g/L.h. A quantidade de açúcar redutor total na entrada do segundo reator ainda era baixa 41,8 g/L. Como o pH na saída do reator 1

foi de 4,3, e na saída do reator 2 3,63, valores estes que permitiram uma boa fermentação alcoólica, este foi utilizado como pH do meio de alimentação nos estudos subsequentes.

#### **4.9.8 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 14 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema**

Aumentando o tempo de residência e mantendo-se o pH e a concentração de sacarose na alimentação, os mesmo do experimento anterior, observou-se que as células do Reator 2 permaneceram decantadas no fundo, indicando a ausência de fermentação pela falta de açúcar na entrada do mesmo. Então neste caso apenas o primeiro reator trabalhou, atingindo um rendimento de 82,12% e saindo 79,52 g/L de etanol do sistema de reatores. A produtividade total do sistema foi de 5,68 g/L.h e o pH final foi de 3,55. Conclui-se que com tempo de residência alto não faz sentido trabalhar com dois reatores em série nestas condições.

#### **4.9.9 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 12 horas e 180 g/L de sacarose na alimentação do sistema**

Ao diminuir o tempo de residência do sistema para 12 horas, observou que o segundo reator era alimentado com 36,53 g/L de ART contribuindo para uma pequena movimentação do leito de células. Neste ponto o rendimento e produtividade foram 79,85% e 5,20 g/L.h, respectivamente.

#### **4.9.10 Fermentação contínua em série com pH inicial 5,0, tempo de residência de 12 horas, 180 g/L de sacarose e metade da quantidade de células em relação ao experimento anterior**

Para diminuir o problema de vazamento e entupimento dos reatores, tentou-se diminuir a concentração de células, mas como resposta houve um aumento do crescimento em detrimento da produção de etanol. Além disso, as células continuaram a flotar e entupir as mangueiras.

Na tentativa de resolver os problemas de entupimento (Figura 4.23), tentou-se colocar um reator de mistura com agitação magnética de volume igual a 1 L entre os dois reatores, recirculando células para o primeiro reator. Funcionou bem inicialmente, mas com a agitação no interior do reator de mistura intermediário, os flocos de células tendiam a passar

para o segundo reator o que provocou o entupimento da mangueira de alimentação do segundo reator.



Figura 4.23 - Dois fermentadores torres com entupimento pelas células.

Substituiu-se o reator de mistura por um decantador intermediário, de onde recirculava células para o primeiro reator e reduzia a quantidade de células que passava para o segundo, pois a alimentação do segundo era realizada pelo sobrenadante do decantador (Figura 4.24). Foram realizados testes preliminares para obter a faixa de vazão de recirculação que possibilitava o funcionamento do sistema contínuo de fermentação alcoólica com dois reatores tipo torre em série. Os testes foram realizados com 180 g/L de sacarose, temperatura 32°C, pH 5,0 e tempo de residência de 8 horas. O volume útil do decantador era de 500 mL e os resultados de rendimento e produtividade obtidos com as vazões de recirculação estão na Tabela 4.9.



Figura 4.24 - Dois fermentadores torres com decantadores intermediários.

Tabela 4.9 – Rendimento e produtividade para as diferentes vazões de reciclo estudadas.

Vazão de reciclo (mL/s)	Rend. Reator 1 (%)	Rend. Reator 2 (%)	Rendimento Global (%)	Produtividade Total (g/L.h)
2,2	<b>69,38±3,5</b>	<b>98,68±0,9</b>	<b>83,13±2,5</b>	<b>9,90±0,3</b>
4,5	<b>84,11±2,5</b>	<b>88,35±2,6</b>	<b>87,16±4,3</b>	<b>9,84±0,4</b>
7,6	<b>94,83±1,8</b>	<b>68,69±1,7</b>	<b>87,12±4,3</b>	<b>9,76±0,1</b>
<b>10,8</b>	<b>89,91±4,1</b>	<b>62,53±3,1</b>	<b>82,46±1,6</b>	<b>8,91±0,5</b>

Com o aumento da vazão de reciclo de células foi possível aumentar o rendimento e a produtividade do reator 1. Porém quando se aumentou muito esta vazão comprometeu o funcionamento do próprio reator 1, pois as células ficam agitadas no decantador e foram para o segundo reator pelo sobrenadante, reduzindo a concentração celular no primeiro reator. Assim, na faixa de vazão de reciclo 2,2 mL/s a 7,6 mL/s o rendimento e a produtividade foram aumentando, mas com a vazão de 10,8 mL/s começou a diminuir os valores de rendimento e produtividade.

No trabalho de Wang et al.(2013), esses autores também utilizaram decantadores intermediários na fermentação alcoólica contínua em um sistema de dois reatores de mistura ligados em série, para recirculação de células. Os resultados obtidos indicaram que um aumento na vazão de reciclo resultou em um aumento da biomassa e consequentemente da concentração do produto no reservatório.

Os resultados dos testes preliminares em termos de concentração inicial de açúcar, pH da alimentação, tempo de residência, configurações de reatores, dispositivos para reciclo e vazões de reciclo de células no primeiro reator foram utilizados para a definição de um planejamento composto central. Neste planejamento foram estudadas as variáveis concentração de sacarose, vazão de reciclo e tempo de residência. Assim as faixas estudadas no planejamento composto central foram 191 a 259 g/L de sacarose na alimentação, vazão de reciclo de 1,6 mL/s a 8,4 mL/s e tempo de residência total (para o sistema de reatores e decantadores) de 3,3 a 8,7 horas.

#### 4.10 Planejamento Composto Central

Os resultados da influência simultânea da concentração de sacarose na entrada do sistema ( $S_0$ ), da vazão de reciclo (V) e do tempo de residência (TR), definido pelo Planejamento Composto Central estão apresentados na Tabela 4.10. Nela estão contidos os resultados em termos de rendimento no reator 1, no reator 2, rendimento total (no sistema de reatores), produtividade no reator 1, produtividade no reator 2, produtividade total e açúcar residual na saída do sistema. Estes resultados foram determinados utilizando a montagem experimental apresentada na Figura 4.25, com uma vazão de recirculação de decantado do segundo decantador para o segundo reator igual a 5,0 mL/s em todos os experimentos.

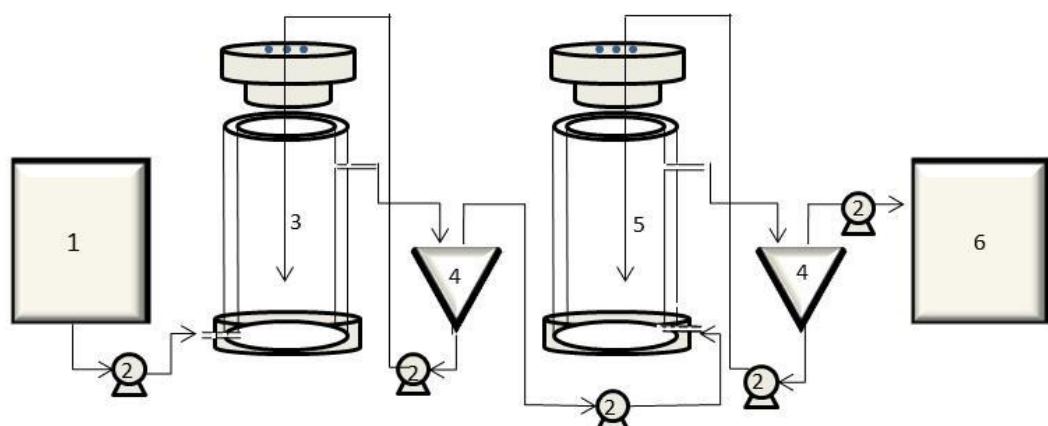


Figura 4.25 -Sistema de fermentação de dois reatores torres conectados em série com decantadores. (1 – tanque de alimentação; 2 – bombas; 3 – primeiro reator; 4 – decantadores; 5 – segundo reator; 6 – tanque de vinho).

Tabela 4.10 – Matriz com os resultados obtidos para avaliar a influência da concentração de sacarose na alimentação, vazão de reciclo de célula e tempo de residência.

Exp.	Rend. Total (%)	Rend. R1 (%)	Rend. R2 (%)	Prod. Total (g <sub>et.</sub> /L.h)	Prod. R1 (g <sub>et.</sub> /L.h)	Prod. R2 (g <sub>et.</sub> /L.h)	ART Residual (g/L)
1	82,8	80,5	91,5	18,98	29,24	8,72	31,2
2	87,5	85,1	93,9	11,19	15,88	6,5	10,32
3	71	81,5	53,4	16,18	26,32	6,04	60,74
4	88,3	88,8	86,9	11,09	16,73	5,45	13,9
5	73,1	64,2	94,6	18,93	23,48	14,37	60,5
6	79,9	76,3	91,7	10,29	14,93	5,66	61,68
7	73,9	64,3	91,9	13,51	15,3	11,72	120,11
8	87,9	85,4	91	11,79	12,53	11,06	40,07
9	81,8	85,3	60,3	13,33	23,93	2,73	9,64
10	76,2	71,1	92,5	14,7	20,85	8,56	40,19
11	89,7	89,2	91,5	16,03	25,59	6,46	26,98
12	85,8	88	80,5	15,16	21,95	9,37	29,37
13	78,4	72,2	82,9	18,42	14,36	22,48	85,08
14	90,1	89,7	91,6	11,78	18,8	4,76	14,26
15	90,9	90,3	92,3	16,89	24,06	9,72	18,55
16	92,4	92	93,8	17,37	27,57	7,18	16,03
17	91,9	92	91,6	17,38	24,93	9,83	14,72

Na Tabela 4.10 observa-se que o rendimento do Reator 1 variou de 64,2% (experimento 5, que é basicamente o mesmo rendimento do experimento 7) à média de 91,7% no ponto central. Nos experimentos 5 e 7, realizados com alta concentração de sacarose na entrada (250 g/L) e baixo tempo de residência (4h), verifica-se um baixo rendimento, possivelmente uma consequência dos baixos tempos de residência e alta concentração de

sacarose na entrada. Uma análise isolada destes dois experimentos indica que os valores da vazão de reciclo não influenciaram no rendimento.

O menor rendimento encontrado no Reator 2 foi no experimento 9, no qual o tempo de residência era intermediário de 6h, mas a alimentação do meio fermentativo foi a menor concentração em sacarose (191 g/L), isto implicou também em menor produtividade no segundo reator e, consequentemente, o menor valor encontrado de sacarose residual. Este fato confirma a necessidade de se trabalhar em altas concentrações de substrato para que o sistema de dois reatores torre em série opere de forma eficiente, resultado este diferente do obtido por Viegas, (2003) que afirmou em seus experimentos que quanto menor a concentração do substrato e maior o tempo de residência maior foi o rendimento obtido no sistema de fermentadores torres em série.

A influência da vazão de reciclo no rendimento do reator 1 é verificada analisando os experimentos 5 e 7, nos quais a concentração de sacarose de entrada foi alta, 250 g/L e o tempo de residência baixo de 4 h, onde observa-se que o aumento da vazão de reciclo de célula não altera o rendimento. Já nos experimentos 6 e 8 nos quais o tempo de residência é alto 8 h, o aumento da vazão de reciclo implica em um aumento no rendimento do reator 1 e consequentemente no rendimento total, uma resposta condizente, pois em um baixo tempo de residência a velocidade de entrada de sacarose é alta, provocando uma maior liberação de CO<sub>2</sub> que auxilia na homogeneização do meio.

Os maiores valores de rendimento total foram encontrados com a concentração de sacarose de 225 g/L (Experimento 11, 14 e pontos centrais) e os maiores valores de produtividade, que é inversamente proporcional ao tempo de residência, foram obtidos nos experimentos 1, 5 e 13. A produtividade alcançada nos pontos centrais se aproximou do máximo de produtividade obtido no estudo do planejamento e o valor de açúcar residual nos pontos centrais também apresentaram-se próximos aos mínimos de açúcares obtidos nos experimentos.

#### **4.10.1 Analise dos resultados obtidos para a resposta rendimento total em etanol das variáveis estudadas**

Com os resultados experimentais do rendimento em etanol total fornecidos pela Tabela 4.10 foram analisadas as respostas estatísticas. A partir de uma regressão múltipla analisou-se os p-valores encontrados pelo teste *t-Student*, onde X<sub>1</sub> representa a concentração de sacarose na entrada do sistema, X<sub>2</sub> representa a vazão de reciclo e X<sub>3</sub> o tempo de

residência. Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, neste planejamento composto central foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações, conforme Tabela 4.9, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.11 os parâmetros significativos lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações das três variáveis estudadas.

Tabela 4.11 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de rendimento total da fermentação no sistema de reatores.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
Média	<b>91,1222</b>	<b>0,8079</b>	<b>0,000000</b>
$X_1$ (L)	<b>-3,8377</b>	<b>0,911701</b>	<b>0,002275</b>
$X_1$ (Q)	<b>-12,3850</b>	<b>1,202390</b>	<b>0,000003</b>
$X_2$ (Q)	<b>-2,8271</b>	<b>1,202390</b>	<b>0,043218</b>
$X_3$ (L)	<b>10,0552</b>	<b>0,911701</b>	<b>0,000002</b>
$X_3$ (Q)	<b>-6,6502</b>	<b>1,202390</b>	<b>0,000365</b>
$X_1X_2$	<b>4,9500</b>	<b>1,100759</b>	<b>0,001496</b>
$X_2X_3$	<b>4,9500</b>	<b>1,100759</b>	<b>0,001496</b>
<b><math>R^2 = 0,97</math></b>			

Utilizando os resultados do rendimento em etanol apresentados na Tabela 4.11, após a regressão múltipla, obteve a Equação 4.3 com os parâmetros significativos.

$$R = 91,12 - 3,84 \cdot X_1 - 12,39 \cdot X_1^2 - 2,83 \cdot X_2^2 + 10,06 \cdot X_3 - 6,65 \cdot X_3^2 + 4,95 \cdot X_1 \cdot X_2 + 4,95 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.3)$$

De acordo com a Equação 4.3, pode ser verificado por inspeção dos seus coeficientes que um aumento no tempo de residência ( $X_3$ ) influencia positivamente no rendimento. Já o coeficiente da variável concentração de sacarose ( $X_1$ ) indica que um aumento na concentração de sacarose implica negativamente no rendimento total do processo, resultado este semelhante

ao obtido pelo trabalho de Guidini (2013), que estudou um planejamento de fermentação alcóolica com leveduras floculantes em batelada alimentada e também obteve um coeficiente de sinal negativo acompanhando a variável concentração inicial de sacarose.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.12, verifica-se que o  $F_{\text{calc}}$  foi significativo. O resultado de F calculado ( $F_{\text{calc}}$ ) foi superior ao F tabelado ( $F_T$ ) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.26.

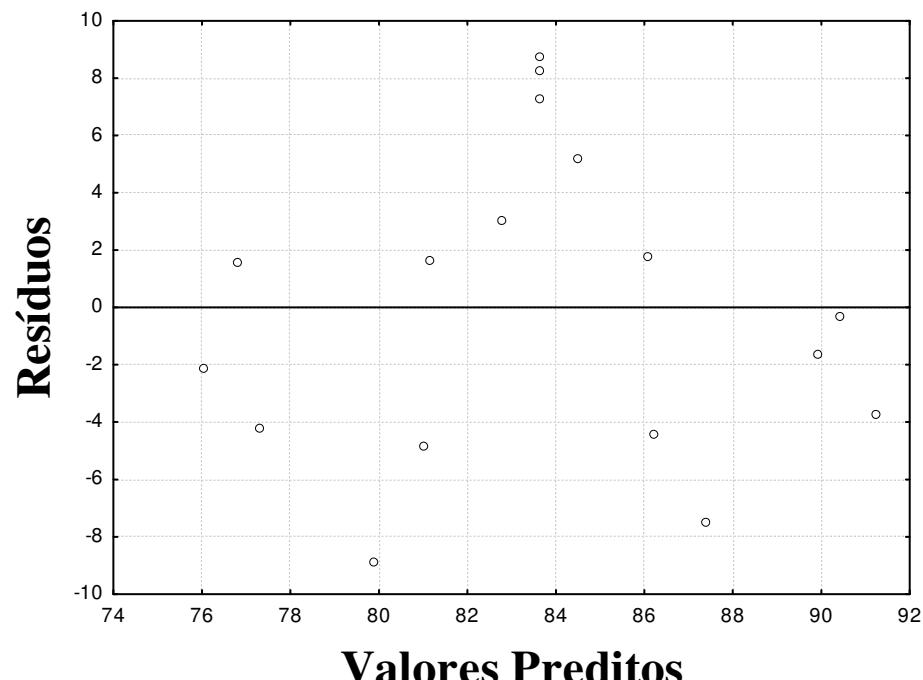
Tabela 4.12 – ANOVA para a resposta de rendimento total.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calc}}$	P - valor
<b>Ressagem</b>	<b>342,51</b>	<b>3</b>	<b>114,17</b>	<b>3,23</b>	<b>0,057</b>
<b>Resíduos</b>	<b>459,66</b>	<b>13</b>	<b>35,36</b>		
<b>Total</b>	<b>802,17</b>				

$$F_T = F_{3; 7; 0,1} = 2,56$$

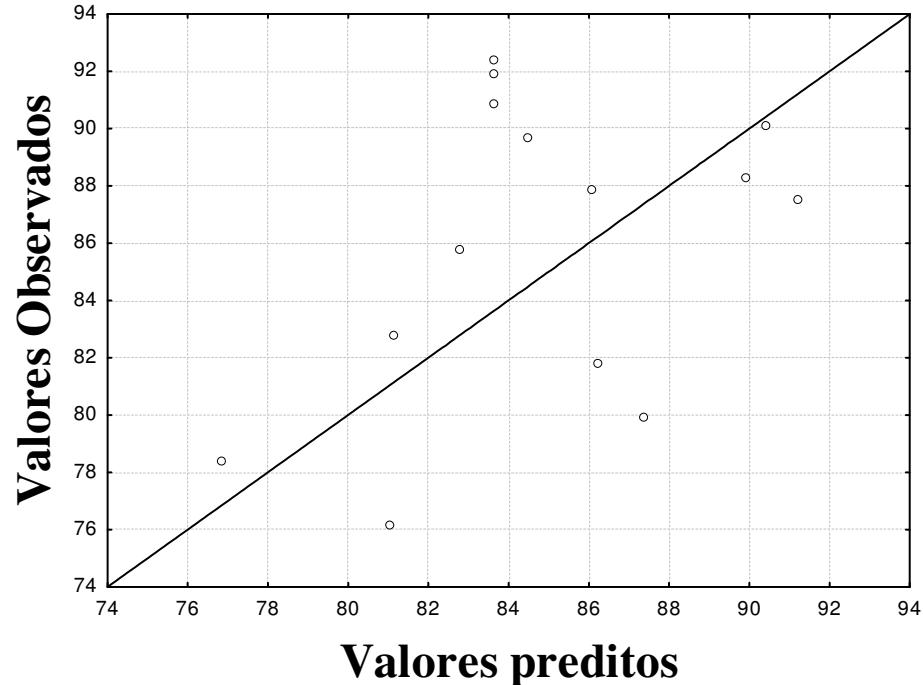
O coeficiente de determinação obtido após o ajuste dos dados experimentais aos modelos (Equação 4.3) indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo, 97% da variabilidade dos dados experimentais foram explicados pela equação empírica proposta.

A análise estatística dos resultados experimentais é apresentada nas Figuras 4.26, 4.27 e 4.28 a seguir:



### Valores Preditos

Figura 4.26 - Distribuição de resíduos relativos ao rendimento total.



### Valores preditos

Figura 4.27 - Valores preditos em relação aos observados em relação ao rendimento total. □

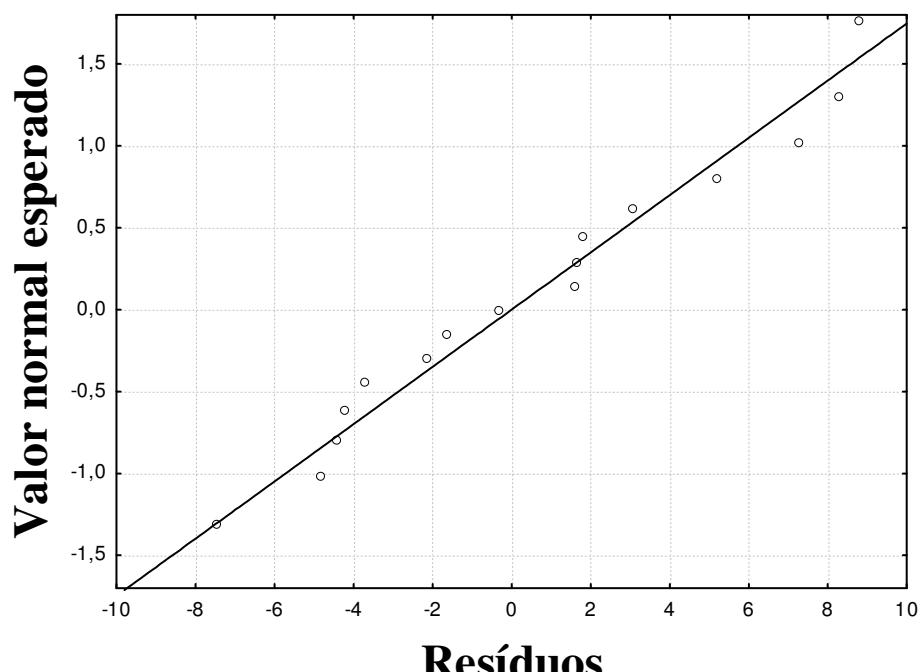


Figura 4.28 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para o rendimento total.

Observando a Figura 4.26, verifica-se que a distribuição dos resíduos comportou-se aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Na Figura 4.27, nota-se que as respostas experimentais obtidas para o rendimento total da fermentação apresentaram valores próximos aos fornecidos pela Equação 4.3.

Com o modelo obtido para a resposta de rendimento total da fermentação alcoólica nos dois reatores torres em série usando leveduras floculantes foi possível construir as superfícies de resposta para analisar as regiões de interesse, apresentadas nas Figuras 4.29, 4.30 e 4.31.

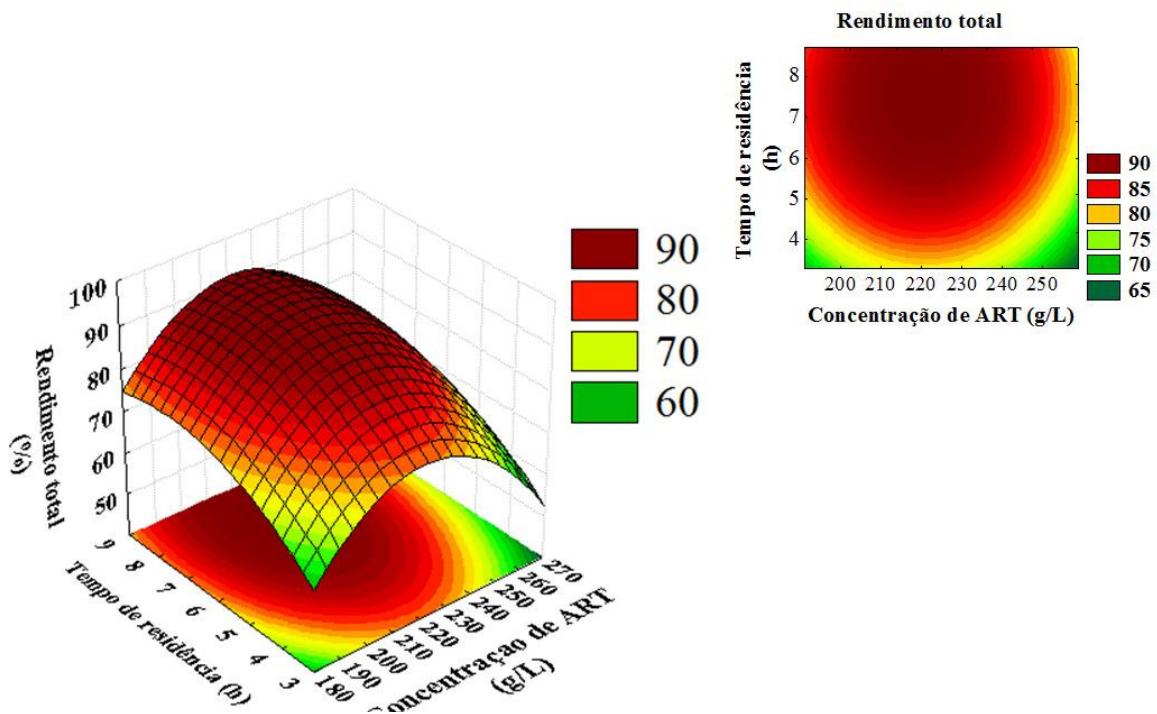


Figura 4.29 - Superfícies resposta da influência da concentração de ART e tempo de residência no Rendimento total do sistema fermentativo.

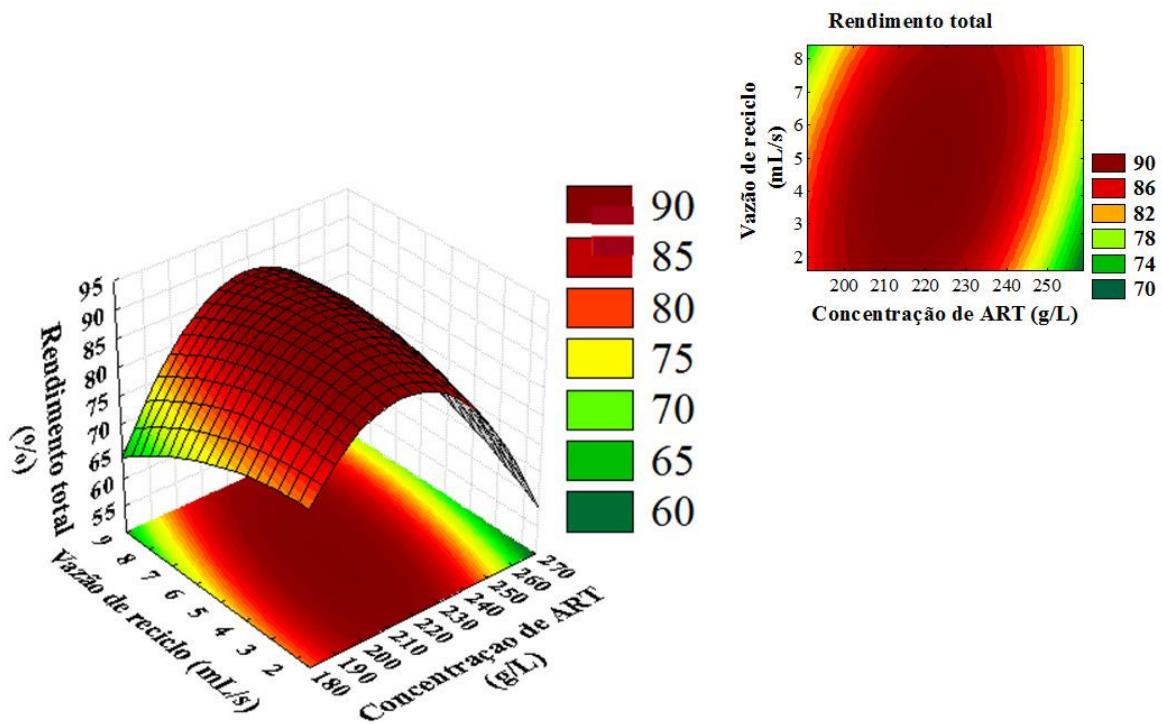


Figura 4.30 - Superfícies resposta da influência da concentração de ART e vazão de reciclo no Rendimento total do sistema fermentativo.

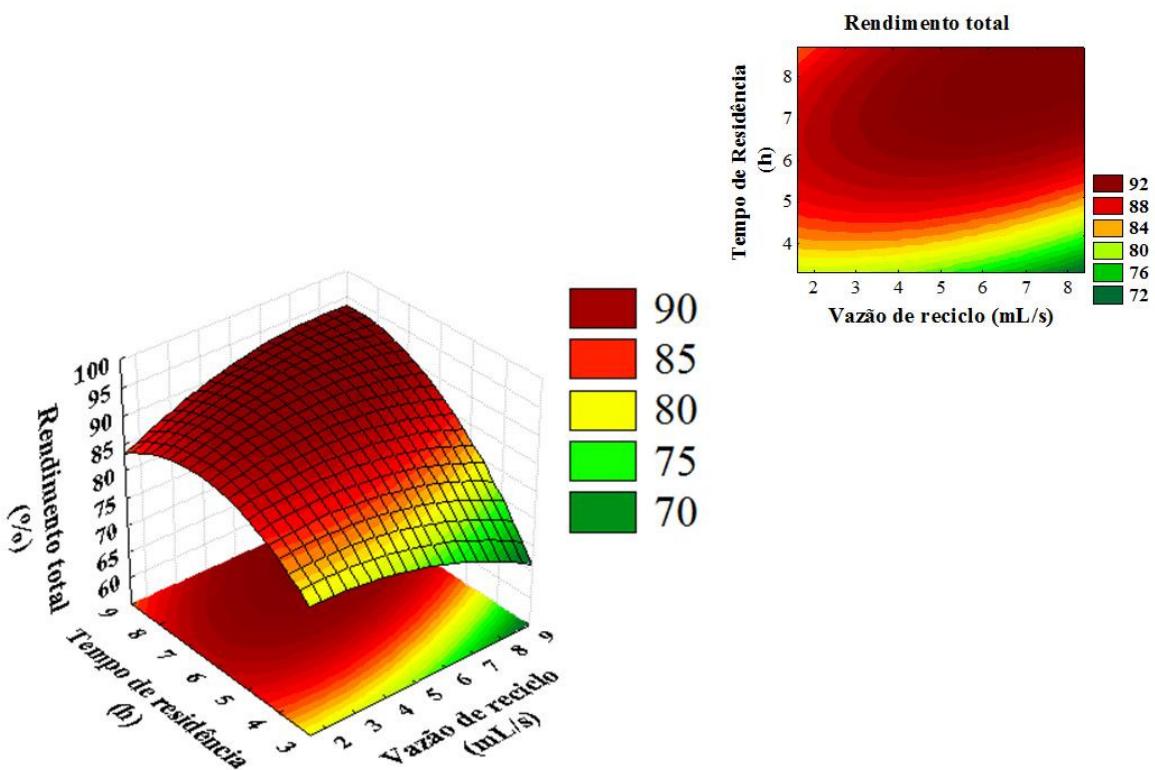


Figura 4.31 - Superfícies resposta da influência da vazão de reciclo e tempo de residência no Rendimento total do sistema fermentativo.

Pelos gráficos das Figuras 4.29, 4.30 e 4.31 ficam nítidas as regiões ótimas, analisando a influencia de duas variáveis estudadas na resposta de rendimento total. Na Figura 4.31, observa-se que a região ótima está um pouco deslocada para valores mais altos de tempo de residência e vazão de reciclo, indicando a importância da vazão de reciclo para tempos de residência altos.

A concentração inicial de sacarose ótima esta definida próxima ao ponto central, como pode ser observado na Figura 4.29 e 4.30. Nas Figuras 4.29 e 4.31 observa a região mais promissora deslocada para valores um pouco mais altos de tempo de residência. A região da vazão de reciclo na Figura 4.30 é ampla e compreende 2 a 7 mL/s.

#### 4.10.2 Analise dos resultados obtidos para a resposta produtividade em função das variáveis estudadas.

A partir dos resultados obtidos de produtividade pelo planejamento composto central foi realizado uma regressão múltipla para analisar os p-valores encontrados no teste de *t*-Student, onde  $X_1$  representa a concentração de sacarose inicial e  $X_2$  representa a vazão de reciclo e  $X_3$  o tempo de residência. Devido a grande variabilidade inerente aos bioprocessos,

nesta planejamento composto central foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações, conforme Tabela 4.13, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.13 os parâmetros significativos lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações das três variáveis estudadas.

Tabela 4.13 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de produtividade total da fermentação no sistema de reatores.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	p-valor
<b>Média</b>	<b>17,04</b>	<b>0,4337</b>	<b>0,0000</b>
<b>X<sub>1</sub> (Q)</b>	<b>-3,06907</b>	<b>0,6455</b>	<b>0,0007</b>
<b>X<sub>2</sub> (L)</b>	<b>-1,3715</b>	<b>0,4894</b>	<b>0,0187</b>
<b>X<sub>2</sub> (Q)</b>	<b>-1,3432</b>	<b>0,6455</b>	<b>0,0641</b>
<b>X<sub>3</sub> (L)</b>	<b>-5,5265</b>	<b>0,4894</b>	<b>0,0000</b>
<b>X<sub>3</sub> (Q)</b>	<b>-1,8839</b>	<b>0,6455</b>	<b>0,0153</b>
<b>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub></b>	<b>2,4050</b>	<b>0,5909</b>	<b>0,0023</b>
<b>R<sup>2</sup> = 0,95</b>			

Utilizando os resultados do rendimento em etanol apresentados na Tabela 4.13, após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.4 com os parâmetros significativos.

$$\text{Produtividade} = 17,04 - 3,07 \cdot X_1^2 - 1,37 \cdot X_2 - 1,34 \cdot X_2^2 - 5,53 \cdot X_3 - 1,88 \cdot X_3^2 + 2,41 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.4)$$

A resposta produtividade é influenciada fortemente pelo tempo de residência (X<sub>3</sub>). O aumento do tempo de residência implica negativamente na resposta de produtividade, confirmando análise dos dados da Tabela 4.10. A concentração inicial de sacarose não influencia diretamente na produtividade e a vazão de reciclo possui uma baixa influencia negativa na resposta.

Realizando a análise de variância (ANOVA) visualizada na Tabela 4.14, verifica-se que o F<sub>calc</sub> foi altamente significativo (p<0,002). O resultado de F calculado (F<sub>calc</sub>) foi superior

ao F tabelado ( $F_T$ ) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.32.

Tabela 4.14 – ANOVA para a resposta de produtividade total.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calc}}$	P - valor
<b>Regressão</b>	<b>94,62</b>	<b>3</b>	<b>31,54</b>	<b>9,49</b>	<b>0,0013</b>
<b>Resíduos</b>	<b>43,22</b>	<b>13</b>	<b>3,32</b>		
<b>Total</b>	<b>137,84</b>				

$$F_T = F_{3; 7; 0,1} = 2,56$$

O coeficiente de determinação  $R^2 = 0,95$  indica que 95% obtido após o ajuste dos dados experimentais aos modelos (Equação 4.4) indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo.

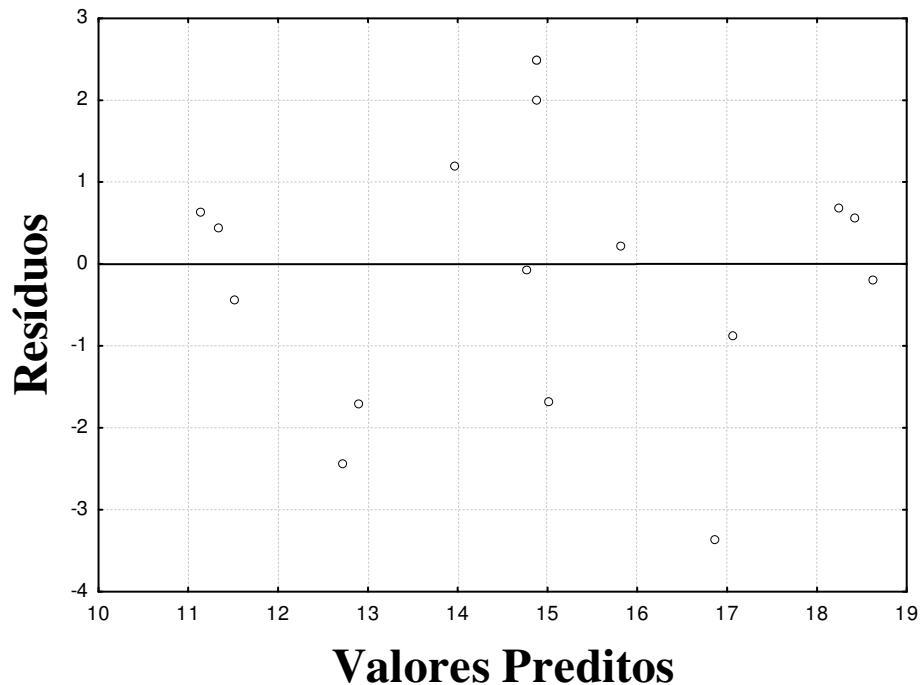
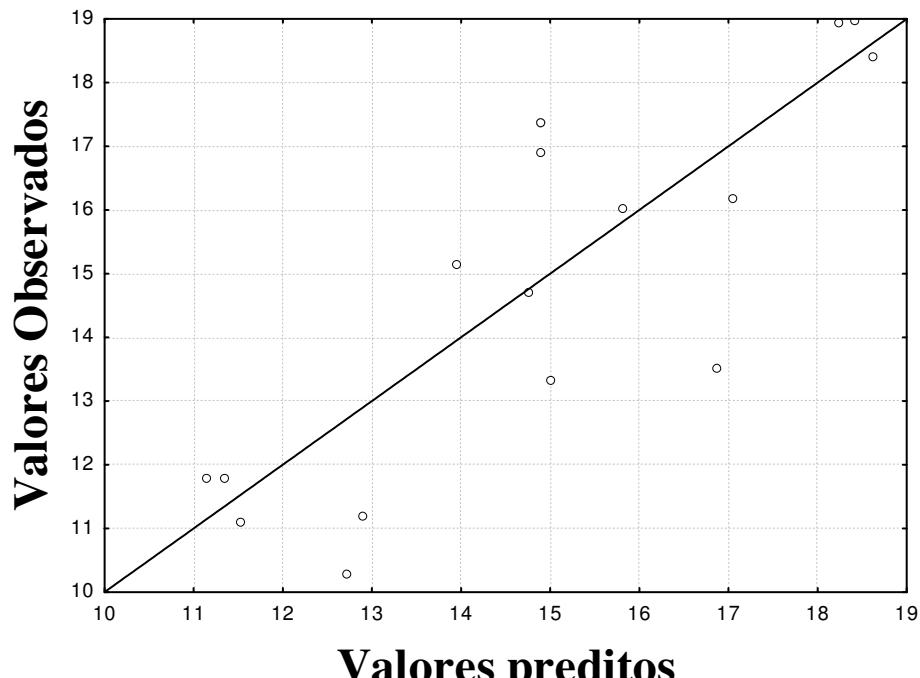
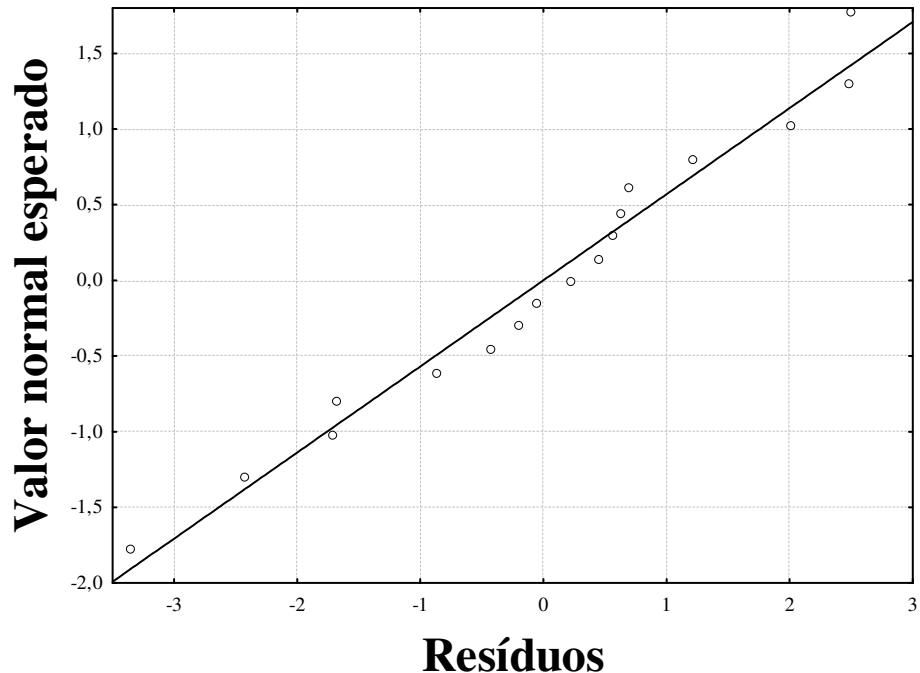


Figura 4.32 - Distribuição de resíduos relativos à produtividade total.



### Valores preditos

Figura 4.33 - Valores preditos em relação aos observados da produtividade total.



### Resíduos

Figura 4.34 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para a produtividade total.

Na Figura 4.32 os resíduos se comportaram aleatoriamente em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição. Foi observado pela Figura 4.33 que as respostas experimentais obtidas para a produtividade total apresentaram valores próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Com o modelo obtido para a resposta de produtividade total da fermentação alcoólica, nos dois reatores torres em série usando leveduras floculantes, foi possível construir as superfícies de resposta para analisar as regiões de interesse, apresentadas nas Figuras 4.35, 4.36 e 4.37.

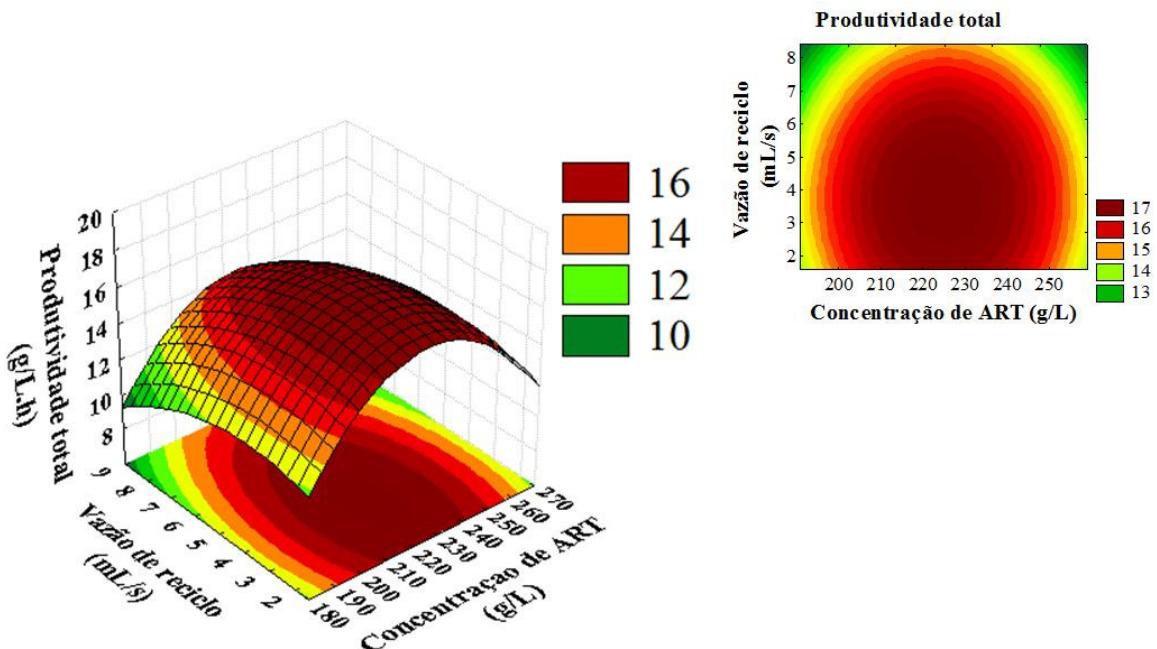


Figura 4.35 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e vazão de reciclo de células na produtividade total do sistema fermentativo.

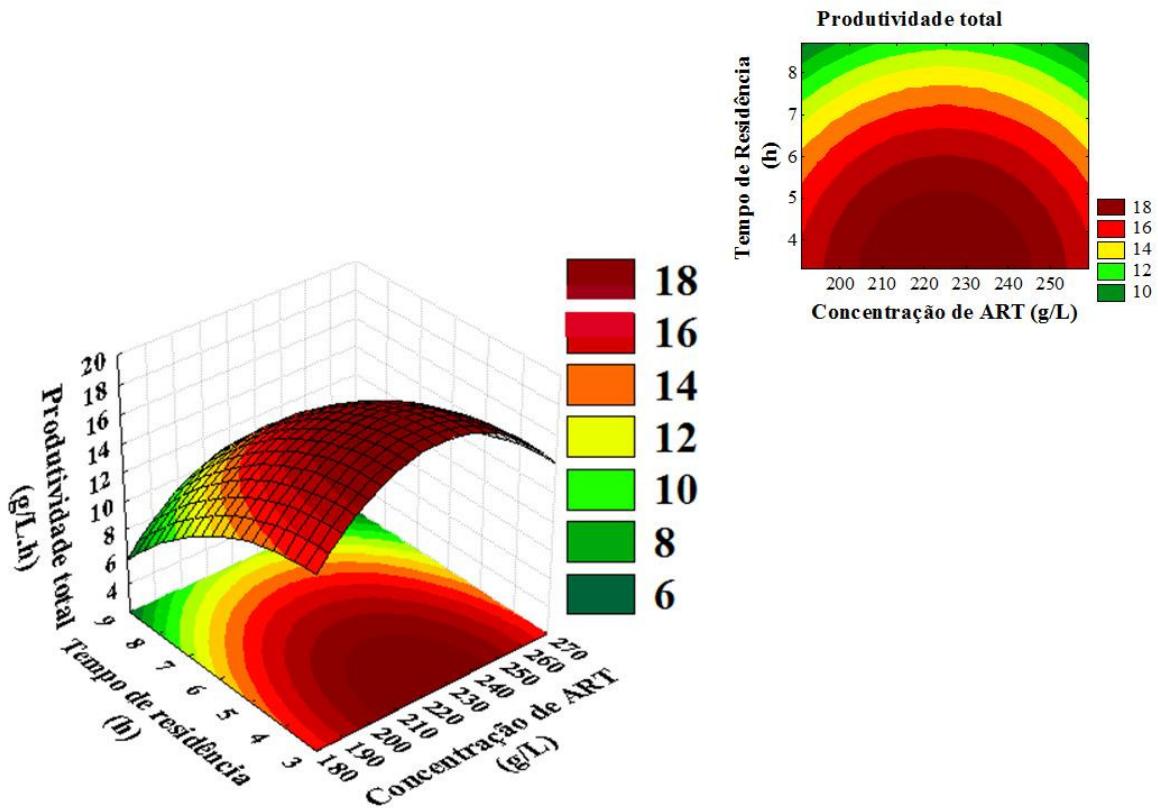


Figura 4.36 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e tempo de residência na produtividade total do sistema fermentativo.

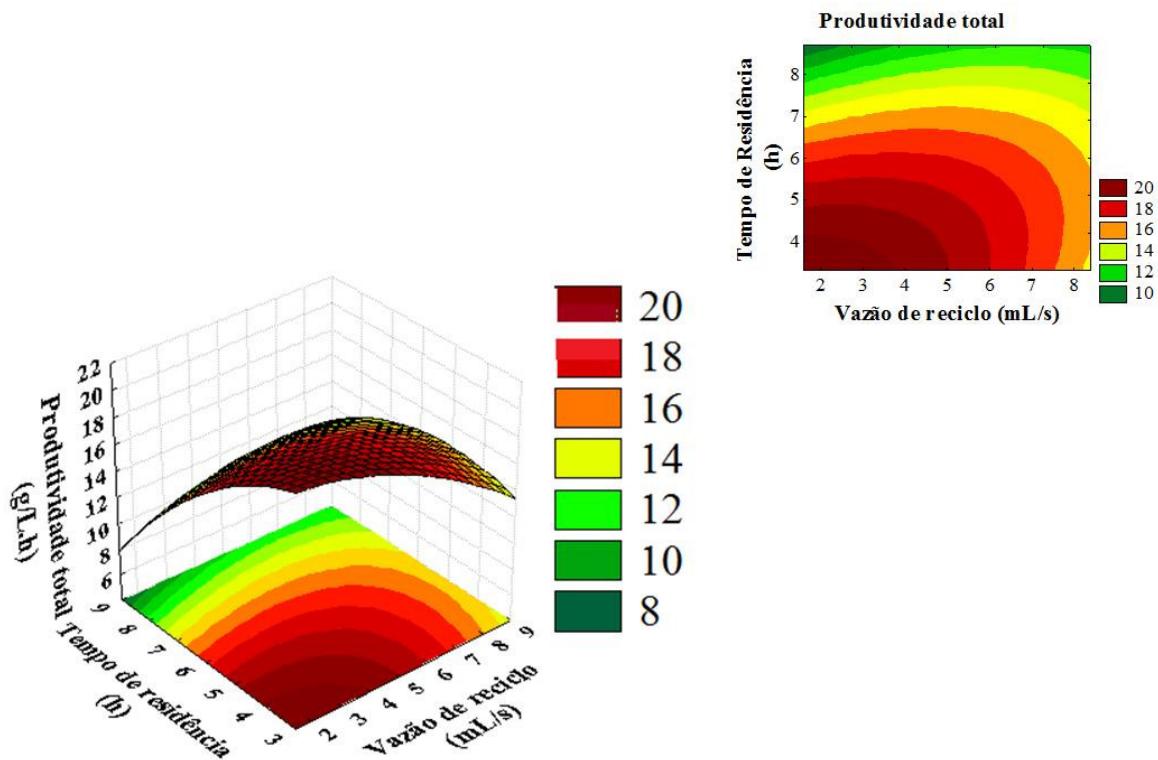


Figura 4.37 – Superfícies resposta de resposta da influência do tempo de residência e vazão de reciclo de células na produtividade total do sistema fermentativo.

Com as superfícies mostradas nas Figuras 4.35, 4.36 e 4.37 é possível observar as regiões de otimização, analisando duas variáveis de cada vez. Na Figura 4.37 a melhor produtividade obtida foi com valores baixos de vazão de reciclo e tempo de residência. Isso é confirmado pela Figura 4.36 que com tempos de residência baixos se obtêm melhor produtividade, que também pode ser concluído pela Equação 4.4. A concentração ótima de sacarose na alimentação se encontra na faixa central dos valores estudados dessa variável.

#### **4.10.3 Analise dos resultados obtidos para a resposta do açúcar redutores totais (ART) das fermentações com as variáveis estudadas**

Com os resultados obtidos para o açúcar residual das fermentações alcoólicas do planejamento composto central foi realizada uma regressão múltipla para analisar os p-valores encontrados no teste de *t-Student*, onde  $X_1$  representa a concentração de sacarose  $X_2$  representa a vazão de reciclo e  $X_3$  o tempo de residência. Foi considerado um nível de significância de 90%. Dessa forma, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações, conforme Tabela 4.15, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Estão representados na Tabela 4.15 os parâmetros significativos lineares (L), os termos quadráticos (Q) e as interações das três variáveis estudadas.

Tabela 4.15 – Resultado da regressão múltipla aplicada ao PCC sobre o resultado de açúcar residual total (ART) da fermentação no sistema de reatores.

<b>Fatores</b>	<b>Coeficiente de regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>p-valor</b>
<b>Média</b>	<b>18,4579</b>	<b>4,706164</b>	<b>0,002857</b>
<b><math>X_1</math> (L)</b>	<b>33,8129</b>	<b>6,175472</b>	<b>0,000271</b>
<b><math>X_2</math> (L)</b>	<b>12,1140</b>	<b>6,175472</b>	<b>0,078224</b>
<b><math>X_2</math> (Q)</b>	<b>15,1627</b>	<b>8,144473</b>	<b>0,092254</b>
<b><math>X_3</math> (L)</b>	<b>-39,4941</b>	<b>6,175472</b>	<b>0,000079</b>
<b><math>X_3</math> (Q)</b>	<b>37,4683</b>	<b>8,144473</b>	<b>0,000979</b>
<b><math>X_2X_3</math></b>	<b>-25,4552</b>	<b>7,456069</b>	<b>0,006613</b>
<b><math>R^2 = 0,92</math></b>			

Utilizando os resultados do açúcar residual apresentados na Tabela 4.15, após a regressão múltipla, obteve a Equação 4.5 com os parâmetros significativos.

$$\text{Açúcar} = 18,46 + 33,81 \cdot X_1 + 12,11 \cdot X_2 + 15,16 \cdot X_2^2 - 39,49 \cdot X_3 + 37,47 \cdot X_3^2 - 25,46 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.5)$$

Os coeficientes da Equação 4.5 relativos à concentração de sacarose ( $X_1$ ) e tempo de residência ( $X_3$ ) são valores de módulos altos, que indicam que um aumento da concentração de açúcar na entrada do sistema, implica em aumento do açúcar residual, o que ocorre no sentido contrário, mas com intensidade semelhantes, com o tempo de residência.

Realizando a análise de variância (ANOVA) para as respostas açúcar residual visualizada na Tabela 4.16, verifica-se que o  $F_{\text{calc}}$  foi altamente significativo ( $p < 0,003$ ). O resultado de F calculado ( $F_{\text{calc}}$ ) foi superior ao F tabelado ( $F_T$ ) para um nível de significância de 10%. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.38.

Tabela 4.16 – ANOVA para a resposta de açúcar residual.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{\text{calc}}$	P - valor
<b>Regressão</b>	<b>8308,64</b>	<b>3</b>	<b>2769,55</b>	<b>6,9961</b>	<b>0,0048</b>
<b>Resíduos</b>	<b>5446,33</b>	<b>13</b>	<b>395,87</b>		
<b>Total</b>	<b>13454,97</b>				

$$F_T = F_{3; 13; 0,1} = 2,56$$

São mostradas na seqüência as Figuras 4.38, 4.39 e 4.40 relativas aos valores preditos com os resíduos, preditos com os observados e a distribuição normal, respectivamente.

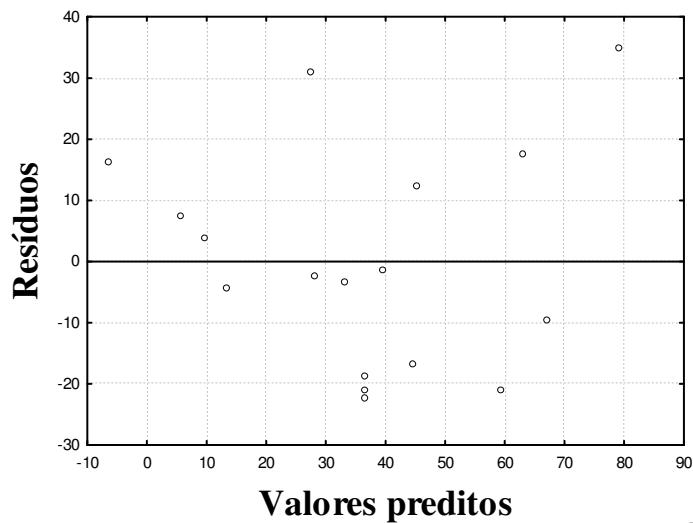


Figura 4.38 - Distribuição de resíduos relativos ao açúcar residual total. □

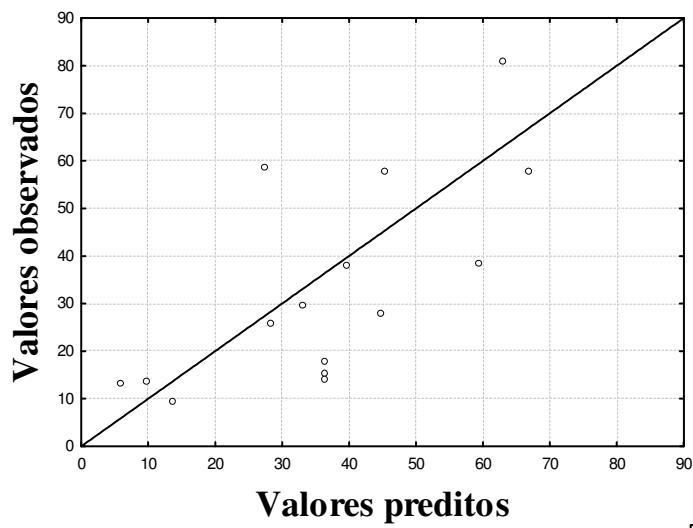


Figura 4.39 - Valores preditos em relação aos observados ao açúcar residual total. □

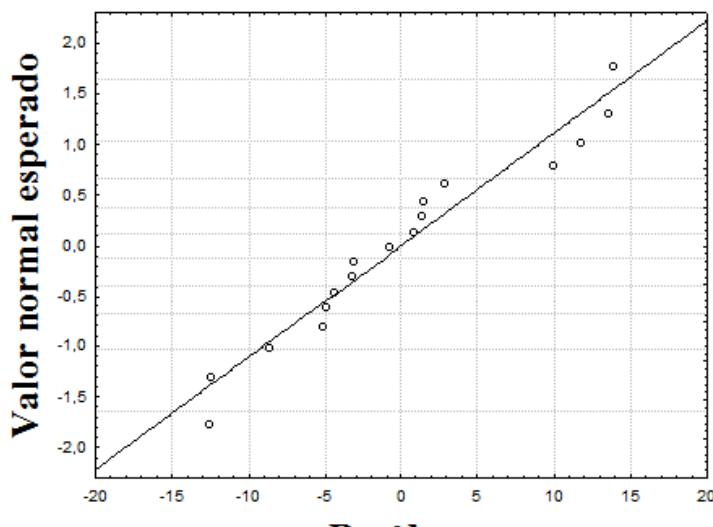


Figura 4.40 - Valores dos resíduos em relação ao valor normal esperado para o açúcar residual total.

Com o modelo obtido para a resposta açúcar residual nos dois reatores torres em série usando leveduras floculantes, Equação 4.5, foi possível construir as superfícies de resposta para analisar as regiões de interesse, conforme as Figuras 4.41, 4.42 e 4.43.

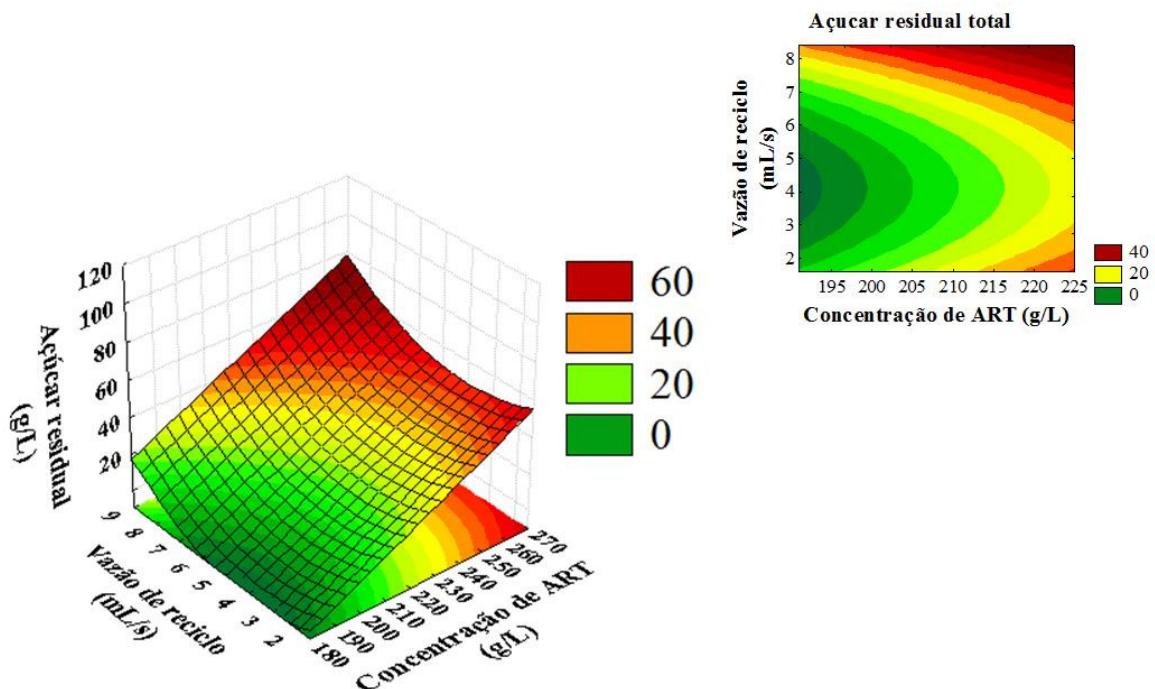


Figura 4.41 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e vazão de reciclo de células na concentração do açúcar residual do sistema fermentativo.

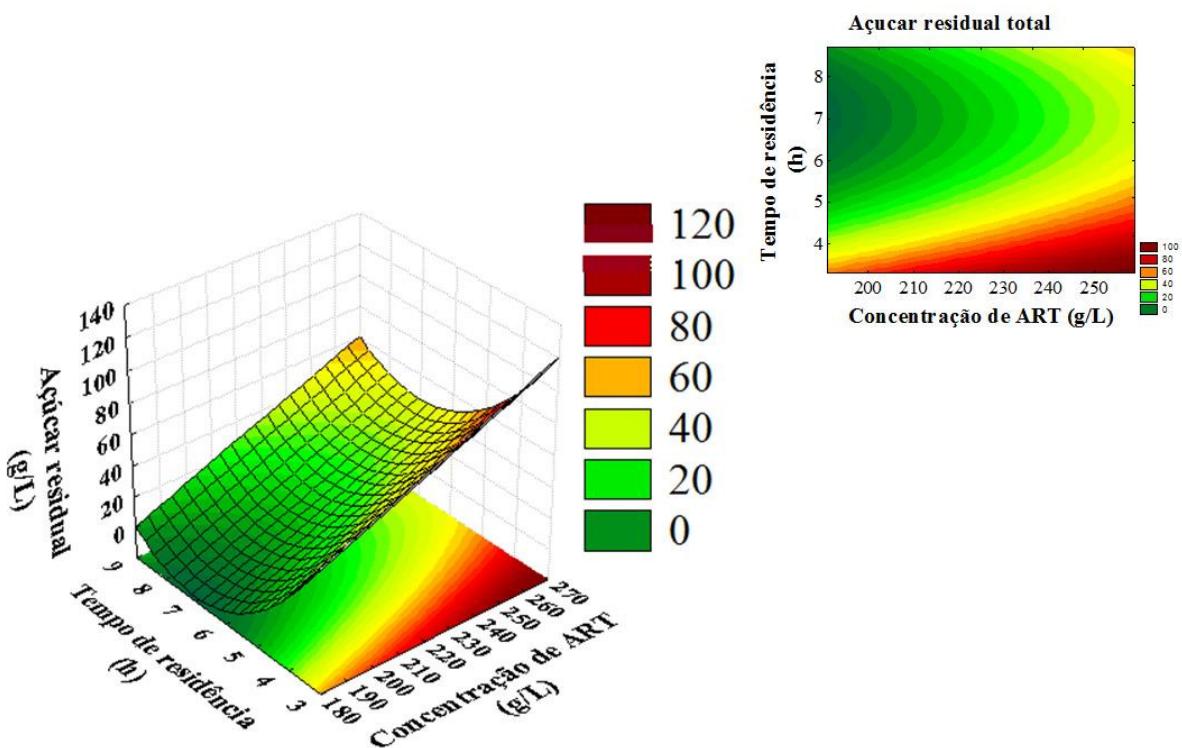


Figura 4.42 – Superfícies resposta de resposta da influência da concentração de ART e tempo de residência na concentração do açúcar residual do sistema fermentativo.

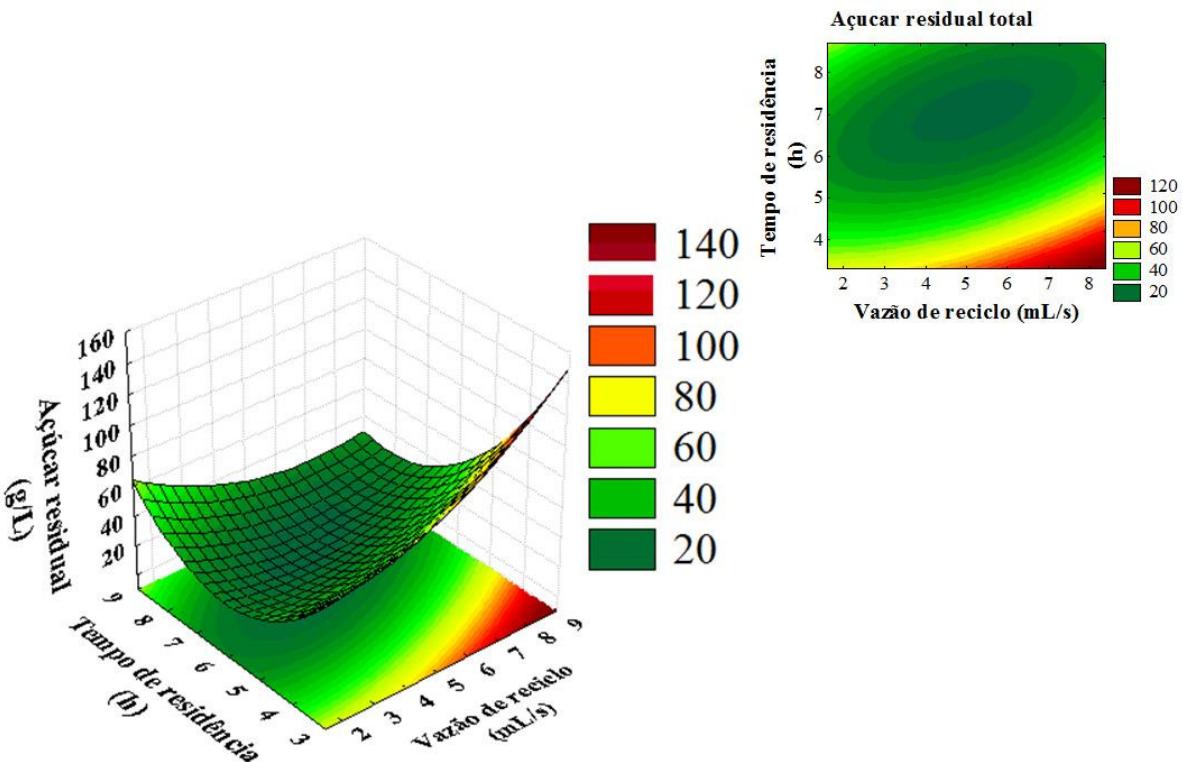
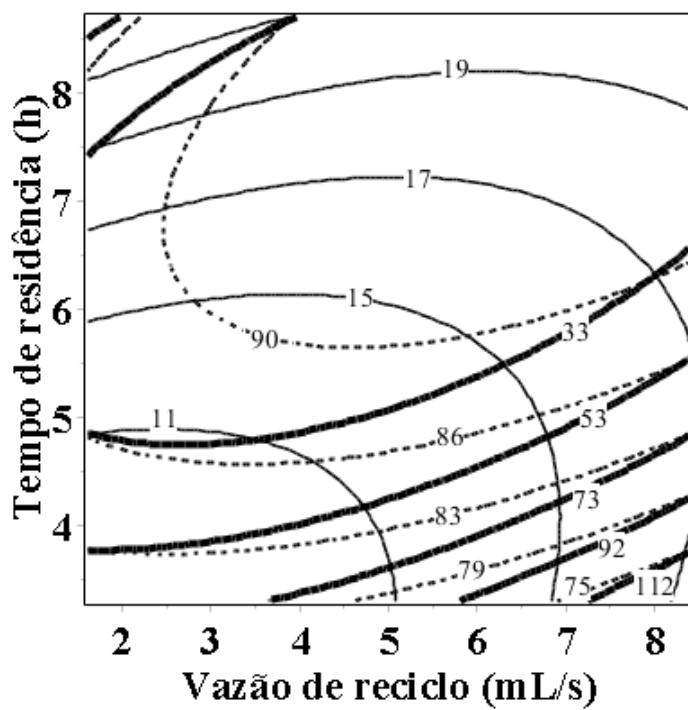


Figura 4.43 – Superfícies resposta de resposta da influência do tempo de residência e vazão de reciclo de células na concentração do açúcar residual do sistema fermentativo.

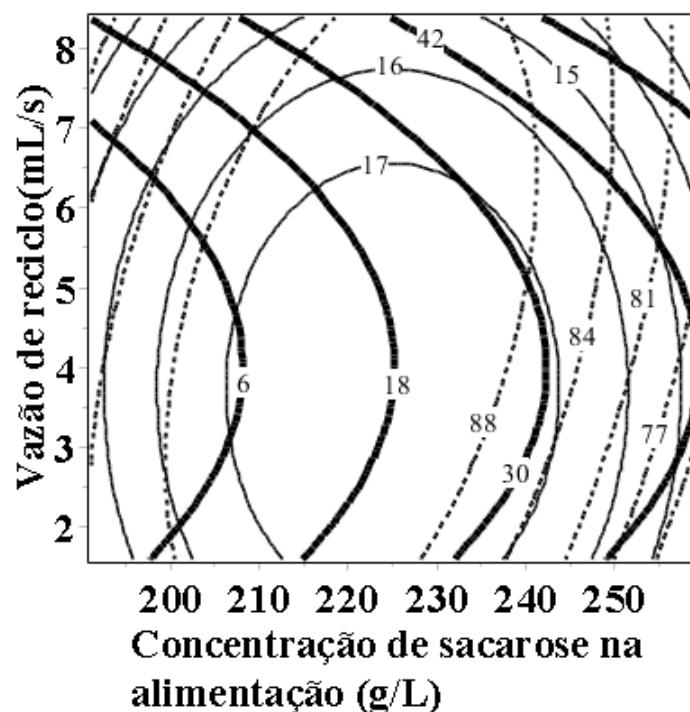
Os menores valores obtidos do açúcar residual foi para baixas concentrações de sacarose na alimentação e para tempos de residência um pouco maiores que os do ponto

central. A vazão de reciclo produziu menor resultado de açúcar no final da fermentação próximo aos valores centrais do estudo.

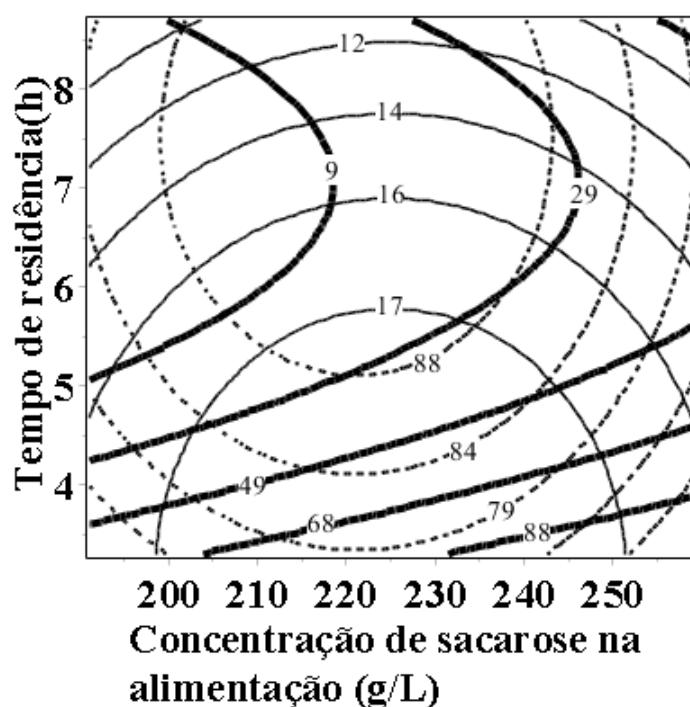
As curvas de superfície de contorno apresentadas na Figura 4.44 foram obtidas com os dados de rendimento, produtividade e açúcar residual total, respectivamente e são importante para avaliação conjunta das variáveis propostas em relação às respostas estudadas com a finalidade de selecionar regiões de operação em que se obtêm os melhores resultados. Assim foi feito as curvas das três respostas obtidas pelo planejamento fixando uma das variáveis e analisando as outras duas conjuntamente, como observado na Figura 4.44.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.44 – Curvas de contorno para Concentração de sacarose na alimentação, vazão de reciclo de célula e tempo de residência.( — produtividade (g/L.h); — açúcar residual (g/L); --- rendimento (%)). (a) Fixando S0 em 225 g/L; (b) Fixando TR em 6h; (c) Fixando V em 5 mL/s.

Na Figura 4.44a das curvas de contorno das variáveis de vazão de reciclo de célula (mL/s) e tempo de residência (h), observa-se que para um baixo valor de tempo de residência o aumento da vazão de reciclo diminui o rendimento total, já para altos valores de tempo de residência o aumento da vazão de reciclo implica positivamente no resultado do rendimento total.

Para a região com maior rendimento procurou-se faixas de valores das variáveis concentrações de sacarose na alimentação, vazão de reciclo de célula e tempo de residência com maiores valores para a produtividade e os menores valores de açúcar residual. Nota-se nas Figuras 4.44a, 4.44b e 4.44c que a região selecionada encontra-se próximo a intervalos de concentração de sacarose de 215 à 230 g/L, vazão de reciclo de 4 a 6,5 mL/s e tempo de residência de 5,5 à 8 h.

Para a validação dos resultados otimizados foi realizado uma fermentação contínua com  $S_0 = 225$  g/L;  $V = 5$  mL/s e  $TR = 8$  h. O tempo de residência escolhido foi de 8 h, dentro da faixa otimizada, por diminuir o açúcar residual e melhorar as condições de processo. Os resultados obtidos foram: rendimento total de 92%, produtividade total de 12,11 g/L.h e açúcar residual de 29,10 g/L, sendo que os resultados obtidos utilizando os modelos foram de 92,82%, 13,33 g/L.h e 18,46 g/L, respectivamente. Os resultados experimentais foram próximos aos do modelo, indicando serem modelos representativos do processo de dois fermentadores tipo torre em série utilizando leveduras de características floculantes para a produção de etanol. Esta condição foi selecionada por estar próxima das condições do ponto central que havia mostrado boa reproduzibilidade experimental e próxima da condição do experimento 14 que apresentou bons resultados para as respostas estudadas. Vale ressaltar que para as concentrações de sacarose maiores que 200 g/L e tempo de residência de 6 a 8 h foi possível obter altos valores de rendimento total (maior que 90%) e principalmente de produtividade total (maior que 11 g<sub>et.</sub>/L.h) mostrando que o processo (reatores tipo torre com leveduras floculantes) é muito promissor em relação aos processos convencionais de operação contínua e em batelada alimentada muito utilizados nas usinas do Brasil.

No trabalho de Wang et al.(2013), utilizando alimentação de 200 g/L de sacarose no sistema de dois reatores de mistura em série com leveduras floculantes e decantadores intermediários, obteve-se uma produtividade de 7 g/L.h e alcançou a produção de 92,8 g/L de etanol e 11,2 g/L de açúcar residual. Neste trabalho os autores concluíram que sistemas com alta taxa de diluição poderiam minimizar o crescimento de bactérias contaminantes, estabilizar mais o sistema e aumentar a produtividade.

No trabalho de Andrietta et al.(2003), ao utilizar 12 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes em um sistema semelhante ao do presente trabalho, sem reciclo de célula, obteve 85,53% de rendimento em etanol, enquanto Viegas 2003 utilizando uma dessas cepas em reatores torre alcançou rendimento de 91%.

Os resultados do presente trabalho, quando comparados aos da literatura, indicam que a cepa C2/00, selecionada pelo CPQBA e utilizada no desenvolvimento deste estudo tem potencial para uso industrial, pois apresentou rendimentos acima de 90%, alta produtividade e excelente capacidade de floculação.

Paiva et al.(1996), utilizaram um sistema de reatores de leito fluidizado para produção de etanol e obtiveram produtividade de 14,4 g/L.h e rendimento de 88,3%.

O tempo de residência escolhido para o trabalho de Viegas, (2003) foi de 3,75 h em cada reator, utilizando três reatores torres em série empregando células floculantes. O primeiro reator recebe metade da alimentação total e o segundo recebe a outra metade, juntamente com o efluente do primeiro reator, e o terceiro reator é alimentado pelo efluente do segundo. Com esse sistema de reatores o autor obteve a maior produtividade encontrada no trabalho que foi 27,39 g/L.h e 90% de rendimento.

#### **4.11Caracterização hidrodinâmica do sistema de reatores**

Os tempos de residência foram obtidos pela técnica de estímulo e resposta de grau, utilizando cloreto de sódio como traçador. Foram realizados estudos com tempos de residência diferentes e dois sistemas de reatores. Primeiramente, foi estudado um sistema de dois reatores torres ligados em série (Sistema 1) com tempo de residência de 17 horas. Com a necessidade de inserir os decantadores intermediários, foi realizado outro estudo do tempo de residência com os reatores torres em série acoplados dois decantadores e reciclo de células (Sistema 2), com tempo de residência de 6 horas.

No sistema 1 a função resposta  $F(t)$  é apresentada na Figura 4.45 obtendo pelos cálculos matemáticos o tempo de residência de 17,09 horas, que comparando ao teórico de 16,7 horas apresentou um desvio de 2,28%.

O sistema 2, de reatores torres em série com decantadores intermediários a função resposta  $F(t)$ , está apresentado na Figura 4.46e o tempo de residência obtido através da DTR foi de 6,92 horas, que comparado ao tempo de residência teórico de 6 horas apresentou um desvio 13,29%. Estes desvios indicam um comportamento próximo ao ideal para os

biorreatores utilizados, uma vez que estes desvios são característicos de formação de curto-circuitos ou “by-pass” no reator.

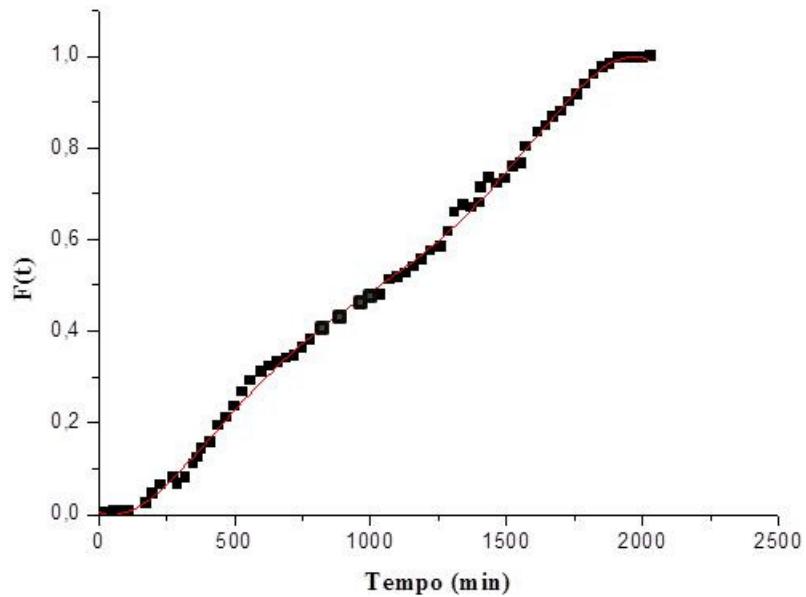


Figura 4.45 – Distribuição cumulativa de  $F(t)$ . Ensaio com meio e biomassa no Sistema 1.

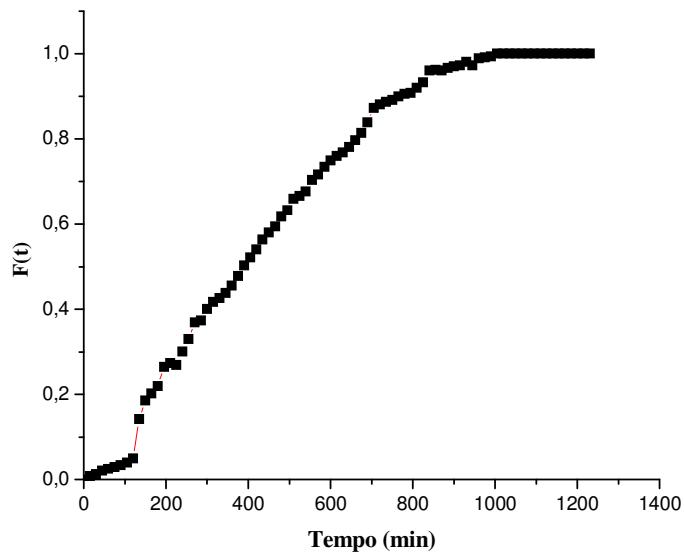


Figura 4.46 – Distribuição cumulativa de  $F(t)$ . Ensaio com meio e biomassa no Sistema 2.

A distribuição cumulativa (Figura 4.45 e 4.46) forneceu a curva  $E(t)$  (derivada primeira da função  $F(t)$ ) necessária ao cálculo da variância e consequentemente do coeficiente de dispersão axial. Para este cálculo a distribuição cumulativa experimental foi ajustada por um polinômio de quinto grau com coeficiente de correlação igual a 0,9984 e 0,9986 para o sistemas 1 e 2, respectivamente.

A partir de uma análise da Figura 4.45 em comparação com a Figura 4.46 para o escoamento no reator tubular, percebe-se uma grande dispersão e, portanto, o número de dispersão pode ser calculado utilizando a Equação 3.15 para sistemas fechados. O número de Peclet encontrando pela Equação 3.14 foi de 2090,98 e 808,72, indicando um número de dispersão (Equação 3.15) de  $4,78 \cdot 10^{-4}$  e  $1,23 \cdot 10^{-3}$  para os sistemas 1 e 2, respectivamente. Com estes números de dispersão para os dois reatores sequenciais com 10% (v/v) de *Saccharomyces cerevisiae*, pode-se concluir que o escoamento em ambos os reatores é do tipo mistura, com dispersão pequena (LEVENSPIEL, 1980).

Para as condições de concentração de sacarose de 160 g/L e 225 g/L e operacionalidade dos sistemas 1 e 2, respectivamente, com concentração celular de  $10^8$  células/mL e pH 5,0 na alimentação, o rendimento e produtividade alcançados foram de 92,16% e 9,83 g/L.h no tempo de residência de 17 horas e 93,8% e 17,37 g/L.h no tempo de residência de 6 horas. Observa-se que com o reciclo de células foi possível diminuir muito o tempo de residência resultando em um aumento da produtividade e do rendimento.

#### **4.12 Efeito da concentração de melaço na fermentação alcoólica com leveduras floculantes.**

A concentração de melaço influenciou a formação de flocos e o rendimento da fermentação alcoólica. Quanto maior foi a concentração de melaço, menores foram os flocos. Com 40 e 50% de melaço em caldo, os flocos se dissolviam no meio, e após a fermentação do açúcar não era possível visualizar a decantação de células. Enquanto com concentrações de 10 à 30% foi possível observar flocos nítidos que decantavam no final da fermentação, como pode ser visto na Figura 4.47.

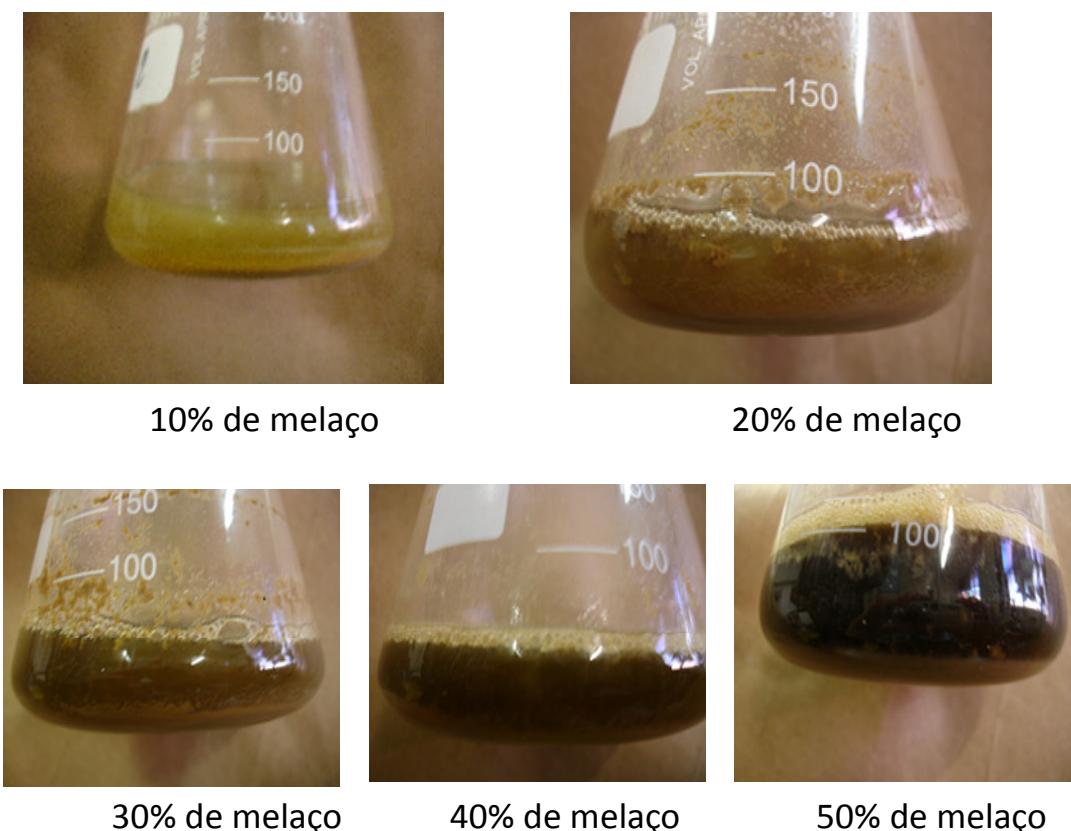


Figura 4.47 -Fermentação alcoólica com leveduras floculantes C2/00 em diferentes concentrações de melaço.

Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 4.17 que a concentração de melaço também influencia nos resultados da fermentação alcoólica. Com as menores concentrações de melaço, de 10 a 30%, estudadas resultou em rendimentos altos e concentrações de sacarose residual aumentando com o aumento da concentração de melaço. Sendo que as concentrações de melaço utilizadas na indústria estão próximas a 12% de melaço em caldo de cana.

Tabela 4.17- Rendimento, produtividade e sacarose residual da fermentação alcoólica para diferentes concentrações de melaço para a levedura C2/00

Concentração de melaço (%)	Concentração inicial de sacarose (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade (g <sub>et</sub> /L.h)	Sacarose residual (g/L)
10	166,55±1,7	90,26±0,9	4,87±0,04	8,29±0,08
20	185,74±3,7	89,28±1,7	4,53±0,09	36,7±0,73
30	204,93±6,1	89,18±0,7	3,8±0,08	79,86±2,1

Algumas possibilidades da influência negativa do aumento da concentração do melaço no meio fermentativo pode ser a presença de sais e/ou em maior concentração dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos e hidroxi-metil-furfural (HMF), que apresentam ação antimicrobiana, afetando assim o desempenho das leveduras. Pois, no caldo decana estão presentes compostos fenólicos e flavonoides responsáveis pela coloração do mesmo, segundo Smith(1976) e Clarke et al.(1985). A concentração desses compostos na cana está relacionada à existência de fungos, bactérias e insetos (CRUIKSHANK & PERKIN, 1964; FRIEND, 1979). Vários trabalhos têm sido realizados para identificação do potencial germicida dos compostos fenólicos e concluíram que a potência germicida aumenta com o aumento do peso molecular dos compostos fenólicos (TOSETTO, 2008).

O acúmulo dos compostos fenólicos ocorre no melaço que posteriormente será fermentado, pois durante o cozimento, a temperatura não é suficiente para degradá-los. Além disso, durante o cozimento, pode ocorrer a degradação térmica da sacarose, formando ácidos orgânicos, ácido lático, fórmico, acético e o hidroxi-metil-furfural (HMF) (TOSETTO, 2008).

Pode-se concluir que com até 30% de melaço em caldo o processo fermentativo apresentou bons resultados.

#### **4.13 Testes com caldo de cana no sistema de reatores**

Após os estudos utilizando meio sintético, realizou-se experimentos com meios industriais, para verificar o funcionamento e eficiência do sistema de reatores em estudo, sistema de dois reatores torres em série com funcionamento contínuo utilizando leveduras de características floculantes, com recirculação de células e decantadores intermediários. Utilizou-se, para isto, meio de caldo de cana e caldo de cana acrescida de melaço, fornecido por Araporã Bioenergia, Minas Gerais, sempre acrescentado 6ppm de Kamoran para o controle da contaminação.

Foi observado que ao alimentar o sistema com caldo de cana, obteve-se rendimento total de 93,8%, mas a sacarose foi totalmente consumida no primeiro reator, sendo necessário apenas um reator torre para a fermentação com caldo de cana, o qual apresentava uma concentração de sacarose de 147,36 g/L.

**4.14 Estudo da estabilidade do processo fermentativo em reatores torres em série**

A estabilidade do sistema foi analisada durante 17 dias, alimentando o sistema com 225 g/L de sacarose, acrescentado de 6 ppm de Kamoran, utilizando vazão de reciclo de 5 mL/s e retirando amostras a cada tempo de residência, ou seja de 6 em 6 horas, e observou-se que o sistema se mantinha estável, com flutuações máximas de 16% no rendimento total apresentado. O experimento não foi realizado por mais tempo, pois apresentou resultados satisfatórios no período e os custos para se manter o processo é alto.

---

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

---

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões deste trabalho, bem como sugestões para trabalhos futuros.

#### **5.1 Conclusões**

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os valores de capacidade fermentativa obtidos pelas seis leveduras *Saccharomyces cerevisiae* floculantes disponíveis para o estudo alcançaram níveis altos, porém uma análise simultânea dos parâmetros implicou na escolha da cepa C2/00 doada pelo CPQBA para a continuação do trabalho;
- O pH, a temperatura e a agitação influenciaram na formação dos flocos e no rendimento e produtividade da fermentação alcoólica. Valores de pH abaixo de 4,0, temperaturas acima de 35°C e agitação acima de 100 rpm provocaram uma dispersão dos flocos no meio. Valores de pH na faixa de 4,0 a 5,0 foram os mais adequados ao processo por conduzirem aos melhores resultados de rendimento e produtividade, além de manter a levedura floculada;
- A levedura floculante C2/00 apresentou uma velocidade específica de sedimentação  $0,178 \text{ min}^{-1}$ , possibilitando a separação e recirculação das células decantadas;
- O uso de antibióticos naturais e comerciais testados no trabalho levaram a resultados satisfatórios, sendo que para o uso de Kamoran e Beta Bio os melhores resultados foram em concentrações um pouco acima do recomendado pelos fabricantes, sendo 6 ppm e 35 ppm, respectivamente;
- O sistema proposto para a fermentação alcoólica com dois reatores torres ligados em série com recirculação de células e decantadores intermediários foi promissor, pois garantiu um bom funcionamento, permitiu que o primeiro reator fosse alimentado com altas concentrações de sacarose, que as células fluidizassem no segundo reator minimizando a perda de células para o

efluente segundo reator. Além disso, o sistema alcançou altos rendimentos e produtividades da fermentação alcoólica com leveduras floculantes;

- Os valores otimizados pelo planejamento composto central para as variáveis estudadas concentração de sacarose na alimentação, vazão de reciclo e tempo de residência do sistema estão compreendidos entre: 215 a 230 g/L, 4 a 6,5 mL/s e 5,5 a 8 h.
- Na condição otimizada do sistema obteve-se um rendimento de 92% e produtividade 12,11 g/L.h, resultadosesses muito bons se comparados aos processos industriais brasileiros;
- Foi observado que ao alimentar o sistema com caldo-de-cana, obteve-se rendimento total de 93,8%, mas a sacarose foi totalmente consumida no primeiro reator, sendo necessário apenas um reator torre para a fermentação com caldo de cana, o qual apresentava uma concentração de sacarose de 147,36 g/L.
- O sistema de dois reatores torre com reciclo de células, operado em processo contínuo se mostrou adequado para fermentação alcoólica utilizando caldo de cana como substrato com rendimentos acima de 90% e também misturas de caldo e melaço até a proporção de 20% de melaço em caldo;
- Com a utilização de misturas de melaço no meio fermentativo observou que para uma proporção maior que 30% de melaço em caldo ocorreu desfloculação.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

As sugestões para trabalhos futuros são:

- Fazer a cariotipagem das seis leveduras de características floculantes disponíveis para o trabalho;
- Realizar PCR para detectar os genes responsáveis pela floculação FLO;
- Medir o tamanho, a distribuição dos flocos e caracterizá-los;
- Obter alguns modelos matemáticos para essa fermentação contínua com células floculantes;
- Dimensionar decantadores ideais para o processo estudado;

- Caracterizar melhor o melaço para verificar a real influência que ocorre com sua utilização com células floculantes;
- Fazer fermentações com outras leveduras floculantes nesse sistema montado com recirculação de células e decantadores intermediários;

---

## CAPÍTULO 6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABNT, NBR 5929: Reciprocating Internal Combustion Engines to Ethanol e Specification. Brazilian Association of Technical Standards, Rio de Janeiro, Brazil, 1978.

ADMASSU, W.; KORUS, R.A; HEIMSCH, R. C. Ethanol fermentation with flocculating yeast. **Chemical Engineering Journal**. v.31, n. 1, p. B1-B8, 1985.

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

ALKASRAWI M., JRAI, A.A., AL-MUHTASEB, A.H., Simultaneous saccharification and fermentation process for ethanol production from steam-pretreated softwood: Recirculation of condensate streams. **Chemical Engineering Journal**. v. 225, p. 574-579, 2013.

ALMEIDA, J.R. “Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinott”. **Semana da fermentação alcoólica**, v. 1, p.. 254-262, Piracicaba, 1960.

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. Piracicaba. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 251p. 1996.

AMORIN, H.V., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G. **Processos de produção de álcool – Controle e monitoramento**, Editora Fementec/FEALQ/ESALQ- USP, Piracicaba, São Paulo, 103 p, 1996.

AMORIN, H.V.. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Editora Fementec, Piracicaba, São Paulo, 448 p., 2005.

ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (II) contínua. **Stab. Açúcar, Álcool, Álcool e subprodutos**, v.9, p. 45-51, 1990.

ANDRIETTA, S.R. Otimização de processo de fermentação alcoólica em múltiplos estágios. **Stab. Açúcar, Álcool, Álcool e Subprodutos**, v. 10, n.2, p. 32-37, 1991.

ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial**. 178p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI, F. Optimum Design of a Continuous Fermentation Unit of an Industrial Plant for Alcohol Production. In: Galindo, E.; Ramires, O.T. (eds). **Advances in Bioprocess Engineering**, p. 47-52, 1994.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB – Açúcar e Álcool e Subprodutos**, v. 13, n. 4, p. 22-25, 1995.

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.G.S., Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência**, Universidade de Campinas, 2006.

ANDRIETTA, M.G.S, ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A.. **Bioetanol – 30 years of Proálcool. International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. 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.

ATALA, D.I.P.. **Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo de produção de etanol**. Tese (Doutor em Engenharia de

Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

BAI F.W, CHEN L.J, ANDERSON W.A, MOO-YOUNG M. Parameter oscillations in very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system. **Biotechnol Bioengineering** v.;88, p.558–66, 2004.

BAI FW, ANDERSON WA, MOO-YOUNG M. Ethanol fermentation technologies fromsugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv.** v. 26, p. 89–105, 2008.

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

BASSO, L.C., AMORIN, H.V., OLIVEIRA, A.J., LOPES, M.L. Yeast selection for fuel etanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v. 8, p. 1155-1163, 2008. DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x

BEAVEN, M. J., CHARPENTIER, C., ROSE, A. H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae*NCYC 431. **J. Gen. Microbiol.** v.128, p. 1447-1455, 1982.

BELLUCO. **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes**. Tese (Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 2001.

BONY, M.; BIDART, F.; CAMARASA, C.; ANSANAY, V.; DULAU, L.; BARRE, P.; DEQUIN, S.. Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. **FEBS Letters**. v. 410, p. 452-456, 1997.

CALLEJA, G. B. **Cell Aggregation**. In The Yeast. ed. A H. Rose and J S. Harrison, v. 2, 2nd edn, p. 165-238. Academic Press, London, 1987.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldoet al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222 (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

CARVALHO, J. C. M. e SATO, S., Fermentação descontínua. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, EdgardBlücher, v. 2, p. 193-199, 2001 b.

CHANGA D. M., WANGB, T.H., CHIENC I.L., HWANG, W.S. Improved operating policy utilizing aerobic operation for fermentation process to produce bio-ethanol. **Biochemical Engineering Journal** v. 68, p. 178– 189, 2012.

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.

COSTA, A.C.A.; JUNIOR, N.P.; ARANDA, D.A.G.. The situation of biofuels in Brazil: New generation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 3041– 3049, 2010.

COSTA, R.C.; SODRÉ, J.R.. Hydrous ethanol vs. gasoline-ethanol blend: Engine performance and emissions. **Fuel** v. 89, p. 287–293, 2010.

COSTA, R. C., SODRÉ, J. R. Compression ratio effects on an ethanol/gasoline fuelled engine performance. **Applied Thermal Engineering** v.31, p. 278 e 283, 2011.

CRUIKSHANK, M. & PERKIN, L. **Biochemistry of phenolic compounds**. Ed. Harborne, Academic Press, London, p. 511-544, 1964.

CUNHA, A.F.. **Construção de floculantes condicionais de *Saccharomyces cerevisiae* para aplicações industriais.** Tese (Doutorado, Biologia funcional e molecular) Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

DIAS, M.O.S., ENSINAS, A.V., NEBRA, S.A., MACIEL FILHO, R., ROSELL, C.E.V., MACIEL, M.R.W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse:integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Res. Des.** v. 87, p. 1206–1216, 2009.

DIAS, M.O.S., JUNQUEIRA, T.L., CAVALETTO, O., CUNHA, M.P., JESUS, C.D.F., ROSELL, C.E.V., MACIEL FILHO, R., BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology** v.103, p. 152–161, 2012.

DIAS, M. O.S.; JUNQUEIRAA, T.L.; CAVALETTA, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C.D.F.; MANTELATTOA, P. E.; ROSSELLA, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMIA, A. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical engineering research and design** v. 91, p. 1411-1417, 2013.

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.

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, **Biotechnology** Department, Portugal, 2006.

DUARTE, J.C., **Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes no processo de fermentação alcoólica.** Dissertação (Mestrado, Faculdade de Engenharia Química) Universidade estadual de Campinas, São Paulo, 2011.

FACCIOTTI, M.C.R. “Fermentação contínua”; In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; Biotecnologia industrial, vol 2, engenharia bioquímica. 1ºed; cap. São Paulo, SP; Editora Edgard BlucherLTda, 2001.

FERNANDES, A.P.F.V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudo sobre a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática.** Tese (Doutorado, Faculdade de ciência e Tecnologia), Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2008.

FERREIRA, R. M. **Modelagem e simulação de biorreatores tipo torre operando com leveduras auto-imobilizáveis para produção de etanol.** (Dissertação de mestrado, Faculdade de engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

FRIEND, G., **Biochemistry of plant phenolic.** In: Recent advances in Phytochemistry vol.12, Swain, Harbone e Van Sumere (eds) Plenum Press, New York, p.557-588, 1979.

FROHMAN, C.A.; ORDUÑA, R.M.. Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* during traditional batch and fed-batchalcoholic fermentations at constant sugar concentrations. **FoodResearchInternational.** v. 53, p. 551–555, 2013.

FURTADO, T.A. e SCANDIFFIO, M.G., Álcool no Brasil – Uma longa história. **Scientific American Brazil**, n. 53, p.66-71, Outubro, 2006.

GALANAKIS C. M , KORDULISB C., KANELLAKIB M., KOUTINASB A.A., BEKATOROUB A., LYCOURGHIOTISB, A..Effect of pressure and temperature on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on c-alumina pellets. **Bioresource Technology** v.114, p. 492–498, 2012.

GALASSI, G.R..**Estudo do processo fermentativo continuo para a produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre.** Dissertação de mestrado Faculdade de engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

GE. X.M., ZANGH L., BAI F.W.. Impacts of yeast floc size distributions on their observed rates for substrate uptake and product formation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 289-295, 2006.

GENISHEVA,Z; MOTA,A.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A.. Integrated Continuous Winemaking Process Involving Sequential Alcoholic and Malolactic Fermentations with Immobilized cells. **Process Biochemistry**. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.procbio.2013.10.005>.

GHOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate. II Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.21, p.1401-1420, 1979.

GROOT WJ, SIKKENK CM, WALDRAM RH, VAN DER LANS; RGJM, LUYBEN,KCH AM. Kinetics of ethanol production by baker's yeast in an integrated process of fermentation and microfiltration. **Bioprocess Engineering** v.8, p.39–47, 1992.

GUIDINI, C.Z., **Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregando *Saccharomyces cerevisiae* de Características Floculantes**. Tese (Doutorado , Faculdade de engenharia química) Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais Brasil, 2013.

IKEGAMI T, YANAGISHITA H, KITAMOTO D, NEGISHI H, HARAYA K, SANO T. Concentration of fermented ethanol by pervaporation using silicalite membranes coated with silicone rubber. **Desalination** 2002; v. 149, p. 49–54, 2002.

JIN, C.K.; CHIANG, H.L.; WANG, S.S. Steady-state analysis of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a proteinphospholipid complex as a protecting agent. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, n. 3, p.249-257, 1981.

JIN, Y. E SPEERS, R.A. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Am Soc Brew Chemical** v.58, p. 108–116, 2000.

JIN, Y., RITCEY, L.L. AND SPEERS, R.A. Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Am Soc Brew Chemical** v. 59, p. 1–9. Kida, K., Yamadaki, M, 2001.

JONES, S.T.; ADMASSU, W.; KORUS, R.A.; HEIMSCH, R. C. Ethanol Fermentation in a Continuous TowerFermentor. **Biotechnology Bioengineering**. v.26, n.7, p.742-747, 1984.

KARAN D. PROÁLCOOL: Cenas do século 20 - TV Cultura, São Paulo, 22 set; 1998, Disponível em: <http://www.tvcultura.com.br/altoescola>.

KODAMA, S., NAKANISHI, H., ARACHCHIGE, T.; THALAGALA, T.P.; ISONO, N.; HISAMATSU, M.. W.. A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 115, n. 5, p. 557-561, 2013

KOPSAHELIS, N.; BOSNEA, L.; BEKATOROU, A.; TZIA, C.; KANELLAKI, M.. Alcohol production from sterilized and non-sterilizedmolasses by *Saccharomyces cerevisiae*immobilized onbrewer's spent grains in two types of continuous bioreactor. **Systems biomass and bioenergy** v.45, p. 87 -94, 2013.

LAUTENSCHLAGER, M.F.M. **Potencial e perspectivas da energia solar no estado de São Paulo.** Secretaria de energia de São Paulo., 2013

LEE JM, POLLARD JF, COULMAN GA. Ethanol fermentation with cell recycling: computersimulation. **BiotechnolBioengineering**v.25, p.497–511, 1983.

LEE, Y. S.; LEE, W. G.; CHANG, Y. K. e CHANG, H. N., Modelling of Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*from a Glucose and Maltose Mixture. **BiotechnologyLetters**, p. 791-796, 1995.

LEITE, I.R.;FARIA, J.R.; MARQUEZ, L.D.S.; REIS, M.H.M; RESENDE, M.M.; RIBEIRO, E.J.; CARDOSO, V.L.. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**. v. 106, p. 611-618, 2012.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, Ed. da Universidade de São Paulo. v. 2, 1974.

LEVENSPIEL, O. The Monod Equation. A Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.22, p.1671- 1687, 1980.

LIMA, U.A. “**Produção de etanol**”, In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; Biotecnologia- Tecnologia das fermentações, vol 1, Biotecnologia, 5° ed; cap. 3; São Paulo, SP, editora Edgard BlucharLtda, 1992.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.. **Biotecnologia industrial**. vol. 3, 1° ed., São Paulo, SP, editora Edgard BlucharLtda, 2002.

LIU, C., 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.

LOUREIRO, V., FERREIRA, H. G. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. **Biotechnology Bioengineering**. v. 25, p. 2263-2269, 1983.

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.

MAIORELLA, B., BLANCHE, H. W, WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering**. v. 25, p. 103-121, 1993.

MARIANO, A. P., COSTA, C. B.B.; ANGELIS, D. F.; FILHO, F. M.; ATALA, D. I. P.; MACIELA, M.R.W.; FILHO, R. M.. Optimisation of a continuous flash fermentation for butanol production using the response surface methodology. **Chemical engineering research and design** v. 88, p. 562-571, 2010.

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.

McNEIL, B. e HARVEY, L.M., Fermentation - a practical approach. 1st ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

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 of 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 flocação condicional.** 150 f. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MONTESINOS, J. L.; LAFUENTE, J.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; SOLÀ, C. , Structured Modeling and State Estimation in a Fermentation Process: Lipase Production by *Candida rugosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, p. 573-584, 1995.

NAGASHIMA, M.; AZUMA, M.; NOGUCHI, S.; INUZUKA, K.; SAMEJINA, H. Continuous fermentation using immobilized yeast cells. **Biotechnology Bioengineering**. v.26, n.8, p.992-997, 1984.

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.

NAGODAWITHANA, T. W., STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “rapid fermentation“. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 31, p. 158-161, 1976.

NISHIWAKI A, DUNN IJ. Analysis of a two-stage fermentor with recycle for continuous ethanol production. **Chemical Engineering Commun.** v. 168, p.207-27, 1998.

NOGUEIRA, L.A.H.; CAPAZ, R.S.. Biofuels in Brazil: Evolution, achievements and perspectives on food security. **Global Food Security.** .v. 2, p. 117–125, 2013.

OBERLING, D.F.; OBERMAIER, M.; SZKLO, A.; ROVERE, E.L.. Investments of oil majors in liquid biofuels: The role of diversification, integration and technological lock-ins. **Biomass and Bioenergy** v.46, p. 270-281, 2012.

OLIVEIRA, S.C; PAIVA, T.C.B.; VISCONTI, A.E.S; GIUDICI, R. Discrimination between ethanol inhibition models in a continuous alcoholic fermentation process using flocculating yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v.74, n.3, p. 161- 172, 1998.

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.

PAIVA, T.C.B.; SATO, S.; VISCONTI, A.E.S.; CASTRO, A.A.B.. Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57, n.58, p. 535-541, 1996.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W.. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal** v.28, p. 36–43, 2006.

REIS, V.R.. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol.** Dissertação (Mestre em Ciências e

Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP, Piracicaba, 2011.

RIBEIRO, F.J., LOPES, J.J.C., FERRARI, S.E.. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica, **Brasil Açucareira**, v.105, n.1, p. 26-30, 1987.

ROFFLER SR, BLANCH HW, WILKE CR. In situ recovery of fermentation products. **Trends Biotechnol**;v.2, p.129–36, 1984.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Viçosa – MG – Brasil, 2009.

ROSA, G.R.. O sucesso do *flex-fuel*. **Anuário Brasileiro da Cana de Açúcar** . p. 39-40, 2005.

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., FACCIOSSI , M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: Schmidell, Willibaldo.(Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 179-192. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001.

SEVEL Y, Y.; PORCIEL, J.P.; RAUZY, G.R.; BABANS, J.P. Paper presented at the 8<sup>th</sup> IFAC Trienal Congress, Kyoto, Japan, Aug., 1980.

SOARES, E.V., TEIXEIRA, J.A. AND MOTA, M. Effect of cultural and nutritional conditions on the control of flocculation expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Can J Microbiol** v.40, p. 851–857, 1994.

SOARES, E.V.; MOTA, M. Quantification of yeast flocculation. **J Inst Brew** v. 103, p. 93–98, 1997.

SOARES EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **J ApplMicrobiol.** v.110, p.1–18, 2010.

SOLOMON, B. D., BARNES, J. R., AND HALVORSEN, K. E.: Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy, **Biomass Bioenerg.**, v. 31, p. 416-425, 2007.

SOUZA, M.A.C., MUTTON, M.J.R.,.Flocação de leveduras por *lactobacillusfermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciênc. agrotec.**,Lavras, v. 28, n. 4, p. 893-898, jul./ago., 2004

STAN, S.; DESPA, F. On the doublet formation in the flocculation process of the yeast cells. **Biosystems**, v. 57, p. 139-145, 2000.

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

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

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

STRATFORD, M. Yeast flocculation – a new perspective. **AdvMicrobPhysiol** v. 33, p. 1–71, 1992.

TAYLOR, N.W.; ORTON, W.L. Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Inst Brew** v. 81, p. 53–57, 1975.

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

TYAGI, R. D.; GUPTAB, S. K.; CHANDB, S.. Process Engineering Studies on Continuous Ethanol Production by Immobilized *S. cerevisiae*. **ProcessBiochemistry**, 27, P. 23-32, 1992.

TOLEDO, E.C.V. **Modelagem, Simulação e Controle de Reatores Catalíticos de Leito Fixo**. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 337p, 1999.

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

TOSETTO, G.M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. Tese (Doutorado, Faculdade de Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, SP Brasil, 2008.

VASCONCELO, J.N., **Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de cana-de-açúcar** Dissertação (Mestrado, escola de Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.. Yeast flocculation: what brewers should know. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 197-205, 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. Utilização de Reatores Tipo Torre com Leveduras Auto-Imobilizáveis para Produção Contínua de Etanol. Apresentado no VII Seminar on Enzymatic Hidrolysis of Biomass – SHEB, Maringá, 2002.

VIEGAS, M. C., **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 150p., 2003.

ZAPERLON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação contínua para a produção de álcool. **Stab. Açúcar, Álcool e Sub-produtos.** v.10, n.4, p.23-28, 1992.

WANG, F. S.; SU, T. e JANG, H.. Hybrid Differential Evolution for Problems of Kinetic Parameter Estimation and Dynamic Optimization of an Ethanol Fermentation Process. **Ind. Engineering Chemistry. Res.**, v.40, p. 2876-2885, 2001.

WANG S, THOMAS KC, SOSULSKI K, INGLEDEW WM. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. **Process Biochemical** v. 34, p. 421–8, 1999.

WANG L., ZHAO X Q, XUE C., BAI F.W., Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, 6:133 doi:10.1186/1754-6834-6-133, 2013.

WANG, F.S.; LI, C.C.; LIN, Y.S.; LEE, W.C.. Enhanced ethanol production by continuous fermentation in a two-tank system with cell recycling. **Process Biochemistry** v. 48, p.1425–1428, 2013.

WATARI, J.; NOMURA, M.; SAHARA, H.; KOSHINO, S.. Construction of flocculent brewers yeast by chromosomal integration of the yeast flocculation gene FLO1. **Inst. Brew.**, v.100, p. 73-77, 1994.

WENDHAUSEN, R.; FREGONESI, A.; MORAN, P. J. S.; JOEKES, I.; RODRIGUES, J. A. R.; TONELLA, E.; ALTHOFF, K. Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells. **J. Biosc. Bioeng.** v. 91, p. 48 52, 2001.

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.