



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO NA RESISTÊNCIA  
DA LEVEDURA AO TEOR FINAL DE ETANOL NA FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA**

**MARIANA LOPES CRUZ**

UBERLÂNDIA – MG  
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO NA RESISTÊNCIA  
DA LEVEDURA AO TEOR FINAL DE ETANOL NA FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA**

**Mariana Lopes Cruz**

Orientador: **Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

Coorientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Maria de  
Resende**

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C957a  
2015

Cruz, Mariana Lopes, 1989-  
Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao  
teor final de etanol na fermentação alcoólica / Mariana Lopes Cruz. -  
2015.  
86 f. : il.

Orientador: Eloizio Júlio Ribeiro.  
Coorientadora: Miriam Maria de Resende.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Bioetanol - Teses. 3. Fermentação  
- Teses. 4. Etanol - Teses. I. Ribeiro, Eloizio Júlio, 1957- II. Resende,  
Miriam Maria de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 11 DE FEVEREIRO DE 2015

BANCA EXAMINADORA



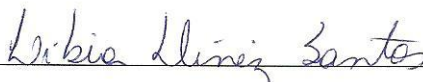
---

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



---

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



---

Profª. Drª. Líbia Diniz Santos  
(FEQ/UFU)



---

Profª. Drª. Carla Zanela Guidini  
(FEQ/UFU)



---

Profª. Drª. Fernanda Ferreira Freitas  
(UFG)

---

## AGRADECIMENTOS

---

À Deus que é a maior razão de meu viver, por mais uma oportunidade de crescimento e aprendizado confiada a mim, pelo seu amparo, auxílio e amor incondicional.

À Universidade Federal de Uberlândia – UFU e Faculdade de Engenharia Química – FEQ pela oportunidade de participar do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química.

Aos meus amados pais Marcelo e Haimeé que foram a base, a força e o amor incondicional e sem medidas.

À minha irmã Amanda e a todos os meus familiares pela força, carinho e apoio.

À minha avó Nininha pelas orações e preocupação e à Avó Maria pelo maior exemplo.

Ao Rômulo pelo amor, carinho, compreensão e pelo companheirismo principalmente nos momentos de dificuldade em que estive sempre comigo.

Ao meu orientador, mestre, amigo e “pai postiço”, Professor Eloízio Júlio Ribeiro, pela amizade, confiança, orientação, aprendizado e modelo de dedicação à pesquisa.

À professora e coorientadora Miriam Maria de Resende pela paciência, amizade, disponibilidade e valorosas discussões e correções ao longo deste trabalho.

Aos queridos amigos: Felipe, Fernando, Fabíola e Marcela os quais contribuíram significativamente para a realização deste trabalho por alguns ou durante todo o período do mestrado, por tornar o período de execução dos créditos obrigatórios do programa menos estressante e pelos momentos de descontração, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos amigos, sempre presentes mesmo que de longe, Laura, Anna Érika, Heloísa, Dermival, Matheus, Vinícius e Maria Clara muito obrigada pela torcida e carinho.

Aos funcionários da FEQUI: Cecília, Silvino, Neuender, Humberto, Tiago, Édio, Paulo, Roberta e Cleuzilene pela disposição e prontidão em ajudar-me sempre que precisei.

As alunas de iniciação científica Ana Luisa e Isabela pela ajuda prestada.

Aos amigos de laboratório, pela amizade e companheirismo.

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

Ao engenheiro Jaime Finguerut do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) pelas sugestões ao trabalho.

À Empresa ABBrasil, pelo fornecimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y940.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que tornaram de alguma forma possível a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTADE TABELAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Biocombustíveis.....	4
2.1.1 Etanol 1ª geração.....	7
2.1.2 Etanol 2ª geração.....	8
2.2 Processos da fermentação alcoólica.....	9
2.2.1 Processo descontínuo - Batelada.....	10
2.2.2 Batelada alimentada.....	10
2.2.3 Batelada contínuo.....	13
2.3 Bioquímica da fermentação alcoólica.....	14
2.4 Fatores que influenciam na fermentação alcoólica.....	17
2.4.1 Levedura.....	18
2.4.2 Temperatura.....	19
2.4.3 pH.....	20
2.4.4 Nutrientes.....	21
2.4.5 Subprodutos.....	22
2.5 Fermentação com alto teor alcoólico.....	23
<b>CAPÍTULO 3– MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Materiais.....	25
3.1.1 Microrganismo.....	25
3.1.2 Meio de cultura.....	26
3.1.3 Unidade experimental.....	26
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Determinação das concentrações de açúcares, ácidos e de etanol.....	27
3.2.2 Determinação da viabilidade celular.....	27
3.2.3 Determinação da biomassa.....	28

3.3 Cálculos relacionados às fermentações.....	29
3.3.1 Rendimento.....	29
3.3.2 Produtividade.....	29
3.4 Experimentos preliminares.....	29
3.4.1 Resistência da levedura ao etanol – $P'_{max}$ .....	29
3.4.2 Fermentação batelada repetida a 20°C.....	30
3.5 Adaptação da levedura.....	30
3.6 Planejamento fatorial fracionado.....	31
3.7 Planejamento composto central.....	33
3.8 Experimentos de validação.....	36
3.9 Fermentações com caldo de cana-de-açúcar.....	36
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1 Influência da temperatura na resistência ao etanol da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y904.....	37
4.1.1 Batelada alimentada.....	37
4.2 Viabilidade da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y904 empregando processo fermentativo em batelada repetida.....	40
4.3 Planejamento fatorial fracionado.....	44
4.3.1 Rendimento.....	45
4.3.2 Produtividade.....	48
4.3.3 Açúcar residual.....	51
4.3.4 Avaliação do planejamento fatorial para as respostas estudadas.....	53
4.4 Planejamento composto central.....	54
4.4.1 Rendimento.....	56
4.4.2 Produtividade.....	61
4.4.3 Açúcar residual.....	66
4.5 Experimentos de validação.....	71
4.6 Fermentações com caldo de cana-de-açúcar.....	74
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>78</b>
<b>CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 8 – APÊNDICE.....</b>	<b>86</b>

---

**LISTA DE FIGURAS**


---

Figura 2.1 -	Matriz energética brasileira e mundial.....	5
Figura 2.2 -	Fluxograma da produção de açúcar e etanol.....	6
Figura 2.3 -	Representação esquemática de uma dorna em batelada alimentada com recirculação de fermento.....	12
Figura 2.4 -	Fluxograma simplificado da conversão de glicose a etanol.....	14
Figura 2.5 -	Esquema da fermentação e da respiração.....	16
Figura 2.6 -	Rota metabólica do <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	17
Figura 3.1 -	Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.....	25
Figura 3.2 -	Fermentador New Brunswick Multigen operando em batelada alimentada.....	26
Figura 3.3 -	HPLC utilizado nas análises de ácidos e açúcares.....	27
Figura 3.4 -	Câmara de NeuBauer.....	28
Figura 3.5 -	Adaptação da levedura por fermentações em shaker.....	31
Figura 4.1 -	Perfis de concentração de sacarose (◻) e concentração de etanol (●) em função do tempo, para o experimento conduzido em batelada alimentada a 20°C.....	38
Figura 4.2 -	Perfis de concentração de sacarose (◻) e concentração de etanol (●) em função do tempo, para o experimento conduzido em batelada alimentada a 25°C.....	38
Figura 4.3 -	Perfis de concentração de sacarose (◻) e concentração de etanol (●) em função do tempo, para o experimento conduzido em batelada alimentada a 32°C.....	39
Figura 4.4 -	Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART (◻), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo para a 1ª Fermentação realizada a 20°C.....	41
Figura 4.5 -	Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART (◻), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo para a 2ª Fermentação realizada a 20°C.....	42
Figura 4.6 -	Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART (◻), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo para a 3ª Fermentação realizada a 20°C.....	43



Figura 4.7 -	Curvas de contorno para a resposta rendimento avaliando as variáveis temperatura, concentração celular no inóculo, concentração ART na alimentação e tempo de enchimento do reator duas a duas.....	47
Figura 4.8 -	Curvas de contorno para a resposta produtividade avaliando as variáveis temperatura, concentração celular no inóculo, concentração ART na alimentação e tempo de enchimento do reator duas a duas.....	50
Figura 4.9 -	Curvas de contorno para a resposta açúcar residual avaliando as variáveis temperatura, concentração celular no inóculo, concentração ART na alimentação e tempo de enchimento do reator duas a duas.....	52
Figura 4.10 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da temperatura.....	57
Figura 4.11 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART) e da temperatura.....	58
Figura 4.12 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART).....	59
Figura 4.13 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração celular no inóculo e da temperatura.....	63
Figura 4.14 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART) e da temperatura.....	64
Figura 4.15 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART).....	65
Figura 4.16 -	Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular no inóculo e da temperatura.....	68

Figura 4.17 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART) e da temperatura.....	69
Figura 4.18 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART).....	70
Figura 4.19 - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado a 26°C.....	72
Figura 4.20 - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado a 26°C, com adaptação da levedura.....	73
Figura 4.21 - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado com caldo de cana-de-açúcar a 32°C.....	74
Figura 4.22 - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado com caldo de cana-de-açúcar a 24°C.....	75
Figura 4.23 - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado com caldo de cana-de-açúcar a 24°C, sem ajuste do pH no inóculo.....	76

---

**LISTA DE TABELAS**


---

Tabela 3.1 -	Massa de sacarose adicionada ao meio.....	30
Tabela 3.2 -	Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ para os experimentos realizados - valores reais e codificados.....	33
Tabela 3.3 -	Relação entre concentrações celulares no inóculo e no reator.....	34
Tabela 3.4 -	Matriz do Planejamento Composto Central do efeito da temperatura, concentração celular e concentração de substrato na alimentação (ART).....	35
Tabela 4.1 -	Matriz do planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ e suas respectivas respostas em 24 horas de fermentação.....	44
Tabela 4.2 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta rendimento, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	45
Tabela 4.3 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta produtividade com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	48
Tabela 4.4 -	Resultados da regressão múltipla para a resposta açúcar residual, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	51
Tabela 4.5 -	Variáveis utilizadas no PCC e suas respostas em 10 horas de fermentação.....	55
Tabela 4.6 -	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento.....	56
Tabela 4.7 -	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta produtividade.....	61
Tabela 4.8 -	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta açúcar residual.....	66

---

**LISTA DE SÍMBOLOS**

---

$C_{etanol_f}$	Concentração de etanol ao final da fermentação	g/L
$P'_{máx}$	Concentração máxima de etanol	g/L
$C_{ART_i}$	Concentração açúcar redutor total inicial	g/L
ART	Açúcares redutores totais	g/L
T	Tempo de fermentação	h
$Y_{P/S}$	Rendimento em etanol	%
$Pr_{etanol}$	Produtividade	$\frac{g_{etanol}}{L.h}$

---

## RESUMO

---

O aumento do consumo de energia, o esgotamento dos combustíveis fósseis e o aumento das preocupações com o meio ambiente se tornaram fortes justificativas para geração de energia aplicada ao uso de biocombustíveis. Na expansão da produção de bioetanol pelas usinas brasileiras, a incorporação de processos inovadores e o desenvolvimento tecnológico cumpriram um papel essencial, com incremento da eficiência na produção e progressiva redução dos impactos ambientais e economia agrícola, principalmente no que diz respeito à redução do volume de vinhaça, subproduto da fabricação de etanol. Neste trabalho estudou-se a resistência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 no processo de fermentação alcoólica operando em reator batelada alimentada, analisando o efeito do tempo de alimentação do reator, da temperatura, da concentração de inóculo e substrato sobre o rendimento fermentativo, produtividade e concentração residual de açúcares redutores. Os ensaios foram realizados em reator de bancada utilizando meio sintético à base de sacarose e extrato de levedura. As concentrações de açúcares e etanol foram determinadas por cromatografia líquida (HPLC), e as concentrações de células foram determinadas pelo método espectrofotométrico. Através de uma análise estatística realizada no *Software Statistica 7.0* foi possível determinar as faixas que maximizaram as variáveis estudadas no planejamento fatorial e no planejamento composto central. Como resultado, observou-se que a concentração máxima de etanol na qual a produção do mesmo foi completamente inibida ( $P'máx$ ) foi 137 g/L obtida em 25°C. Foi observado que utilizando a condição gerada no PCC que maximiza as variáveis estudadas, com temperatura de 26°C, 5 horas de enchimento, 240 g/L de concentração de ART e 35 g/L de concentração de inóculo, obteve-se um valor de produtividade de 6,0 g/L.h, 93% de rendimento e 14,4 °GL em 10 horas de fermentação, indicando que as equações de otimização fornecidas pelo PCC conseguiram descrever bem o comportamento do processo de fermentação. Com a levedura adaptada a 4°C, foram obtidos baixos tempos de fermentação e com o uso de caldo de cana como substrato empregando essa mesma levedura adaptada conduziu a altos rendimentos (94%) e produtividades (10,1 g/L.h) quando se utilizou pH de 2,5 no inóculo. A fermentação alcoólica, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em reator batelada alimentada forneceu maiores produtividade e rendimento quando comparados a dados reportados pela literatura, nos quais utilizaram as mesmas condições estudadas neste trabalho.

**Palavras-chave:** etanol, fermentação alcoólica, baixas temperaturas, batelada alimentada.

---

## ABSTRACT

---

The increase in energy consumption, depletion of fossil fuels and growing concerns about the environment have become strong justifications for energy generation applied to the use of biofuels. In expanding production of bioethanol by Brazilian plants, the incorporation of innovative processes and technological development have had a key role, with increased production efficiency and progressive reduction of environmental impacts and agricultural economy, especially with regard to reducing the volume of stillage, a byproduct of ethanol production. In this work was studied the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y904 resistance in alcoholic fermentation process operating in fed batch reactor by analyzing the effect of the reactor feeding time, temperature, concentration of inoculum and substrate on fermentation yield, productivity and concentration residual reducing sugars. Assays were carried out in a mini fermentor using a synthetic medium sucrose-based and yeast extract. The sugar and ethanol concentrations were determined by liquid chromatography (HPLC), and cell concentrations were determined by spectrophotometric method. Through a statistical analysis in *Statistica 7.0* software was possible to determine the tracks that maximized the variables in the factorial experimental design and the Central Composed Design. As a result, it was found that the maximum concentration at which ethanol production thereof was completely inhibited (P'max) was 137 g/L obtained at 25 °C. It was observed that using the condition that maximizes generated at the CCD variables, temperature 26 °C, 5 hours filling, 240 g/L concentration of ART and 35 g/L of inoculum concentration was obtained a value productivity of 6.0 g /Lh, 93% yield and 14.4 °GL in 10 hours of incubation, indicating that the optimization equations given and managed by the CCD describe the behavior of the fermentation process. With the yeast adapted at 4 °C, were obtained low time of fermentation and using sugarcane juice as the substrate using the same adapted yeast led to higher yields (94%) and productivity (10.1 g/L.h) when using the inoculum pH 2.5. Alcoholic fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* yeast fed-batch reactor provided greater productivity and income when compared to data reported in the literature in which they used the same conditions studied in this work.

**Keywords:** ethanol, alcoholic fermentation, low temperature, fed batch.

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

O consumo de energia no mundo baseia-se sobre dois tipos de fontes: os combustíveis fósseis e as energias renováveis. As principais fontes de energia utilizadas atualmente são o petróleo, o gás natural e o carvão. O desempenho das economias emergentes, lideradas pela China e pela Índia proporciona elevadas taxas de crescimento do consumo destes insumos. Assim, a alta demanda, associado à instabilidade política nas regiões produtoras de petróleo e gás natural e os impactos negativos para o meio ambiente produzidos pela queima desses combustíveis, traz preocupações sobre o equacionamento da oferta de energia e seu impacto nos preços (NOVACANA, 2014).

Os principais biocombustíveis produzidos em grande escala são o etanol e o biodiesel, porém, diferentes classes de moléculas possuem propriedades desejáveis para este fim e algumas são passíveis de produção por via microbiana (COSTA, 2011). O Brasil está bem posicionado no setor energético, alguns fatores que o torna atraente para investimentos externos são: participação relevante de fontes renováveis, integração dos setores energéticos, segurança energética e integração regional. O aproveitamento destas oportunidades é um trabalho complexo, onde traz desafios importantes nas áreas da política energética, desenvolvimento institucional e política ambiental (IEA, 2014).

Em 2013 o Brasil teve aproximadamente 41% da sua oferta interna de energia proveniente de fontes renováveis, contra apenas 13,4% no mundo e 9,4% nos países industrializados. Esse perfil resulta numa dependência menor da energia importada (MME, 2013).

A produção de biocombustíveis tem crescido de forma constante e há uma projeção de crescimento ainda maior durante as próximas décadas (HIRA e OLIVEIRA, 2009; ROLZ e LEÓN, 2011). O etanol tem um grande potencial para substituir os combustíveis fósseis, principalmente pelo fato de ser um bicomcombustível renovável, podendo melhorar a segurança energética e reduzir os déficits comerciais. Além disso, a degradação ambiental resultante do excesso de consumo de derivados de petróleo está ameaçando a sustentabilidade da sociedade humana (SMEETS et al., 2008; GOLDEMBERG et al., 2008; BAI et al., 2008; LIU et al., 2009).

De acordo com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE), em 2013 houve uma queda na oferta de energias renováveis do país para 41%, contra os 42,3% registrados em 2012. Os

estudos que vêm sendo desenvolvidos pelo GESEL-UFRJ (2014) explica esse déficit em razão da crise hidrológica, que ficou abaixo da média em 2013, levando o governo a usar mais fonte de energias térmicas para poupar água nos reservatórios. Outra justificativa refere-se ao consumo do setor de transporte, que pelo segundo ano consecutivo apresentou um crescimento considerável. Com a grande expansão da frota de automóveis, o consumo de energia apresentou crescimento de 5,2% com relação ao ano anterior neste segmento.

As pesquisas na linha de processos de produção de etanol são variadas, e uma abordagem que tem despertado bastante interesse recentemente, envolve estudos sobre a resistência da levedura ao teor final de etanol no vinho fermentado. Quanto maior for o teor alcoólico no vinho, menor será o volume de vinhaça gerado e menor o gasto na destilação do vinho. A vinhaça gerada é da ordem de 12 L/L de etanol produzido para um vinho com 8% e de apenas 8 L/L para um vinho com 12% de álcool (DEDINI, 2012), sendo que o segundo maior custo envolvido na produção de etanol está ligado ao descarte da vinhaça (Zi *et al*, 2013). O processo de tratamento anaeróbio é outra alternativa para a correta utilização da vinhaça, pois além de poder ser integrado a produção de etanol, é uma opção sustentável que utiliza os resíduos orgânicos presentes na vinhaça para gerar energia e produtos derivados com valor agregado (MORAES, ZAIAT E BONOMI, 2015).

Diferentes temperaturas afetam de forma distinta a atividade metabólica e o crescimento da levedura. Isso pode ser atribuído, não somente à genética das diferentes cepas, mas também à composição do meio de crescimento e a outros parâmetros como pH, agentes químicos, desidratação osmótica, estado nutricional e fase de crescimento (MONACO, 2007). As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas, não raramente a temperatura nas destilarias alcança 38°C. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol (LIMA *et al.*, 2001).

Dentro deste contexto, reduzir a grande dependência dos combustíveis fósseis e investir em uma economia baseada em fontes de energia sustentáveis torna-se necessário e promove cada vez mais uma evolução econômica e ambiental do planeta. Considerando este aspecto, fermentações alcoólicas conduzidas a temperaturas mais baixas podem levar a uma maior resistência da levedura ao teor final de etanol e também a uma menor geração de subprodutos do metabolismo celular, devido ao menor estresse a que as células estão submetidas. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi estudar a influência dos fatores temperatura, concentração do inóculo, tempo de enchimento do reator e concentração de



substrato, empregando processo em batelada alimentada, avaliando rendimento e produtividade da fermentação.

Como objetivos específicos podem ser citados:

- Determinar a resistência da levedura ao etanol em diferentes temperaturas;
- Adaptar a levedura a temperaturas menores que 32°C;
- Avaliar a influência dos fatores temperatura, concentração do inóculo, tempo de enchimento do reator, concentração de substrato na alimentação no rendimento e na produtividade da fermentação;
- Avaliar o desempenho da levedura em diferentes condições de processo, como na produção de etanol empregando caldo de cana como substrato.

---

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

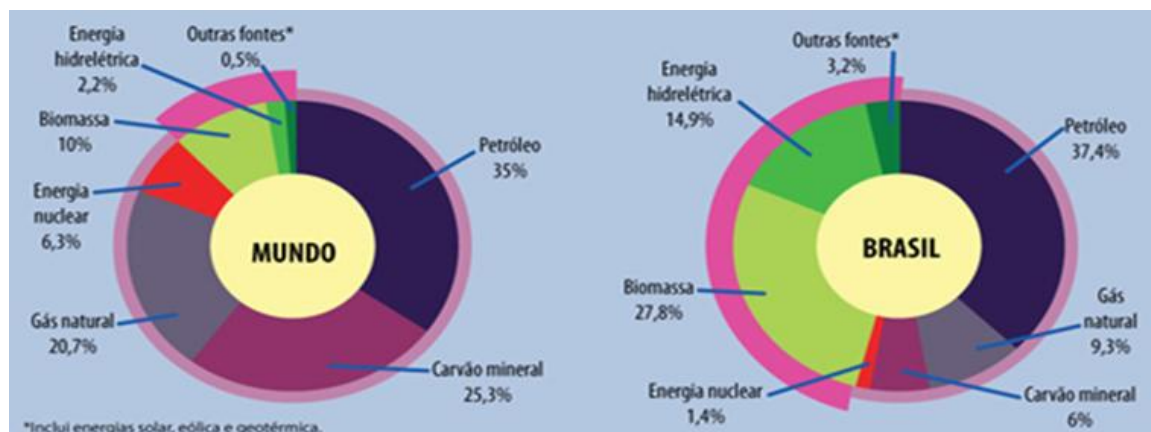
Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho. Foi realizada uma revisão atualizada em artigos científicos, dissertações e teses a respeito do processo de fermentação alcoólica. A ênfase principal dessa revisão foi pela produção de etanol, utilizando cana-de-açúcar como matéria prima e fermentações alcoólicas conduzidas a temperaturas mais baixas e com alto teor alcoólico.

#### **2.1 Biocombustíveis**

Os biocombustíveis são uma importante fonte de energia renovável e têm sido usados principalmente nos setores de transporte e geração de energia, com uma relevante participação na matriz energética nacional. Um dos aspectos mais importantes dos biocombustíveis é a sua capacidade de funcionar como uma alternativa para compensar efeitos negativos provocados pela liberação de gases de efeito estufa (MDIC, 2006). Os biocombustíveis por se tratar de combustíveis oriundos de fontes renováveis, contribuem para redução de emissão de poluentes, já que grande parte dos poluentes resultantes da queima é reabsorvida nos ciclos de crescimento das plantas (NOGUEIRA e CAPAZ, 2013; DIAS et al., 2013).

No Brasil 37% da demanda de energia vem do petróleo e dele são obtidos os combustíveis mais utilizados em veículos automotivos. Altamente poluentes, os gases resultantes da queima dos derivados do petróleo estão entre as principais causas do aumento do efeito estufa no mundo todo. Além disso, a dependência dos combustíveis fósseis pode gerar uma crise energética, uma vez que são fontes finitas e já escassas. A demanda mensal em 2013 por combustíveis apresentou um crescimento de 100% em relação aos níveis de demanda verificados até janeiro de 2006. De acordo com o Ministério de Minas e Energia, parte desse crescimento se deve ao aumento da frota de veículos que, em 2013, foi de 6,5%, quando houve o registro recorde de mais de 3,3 milhões de veículos (MME, 2014).

A matriz energética brasileira é caracterizada pela forte presença de energia renovável, conforme pode ser verificado na Figura 2.1.

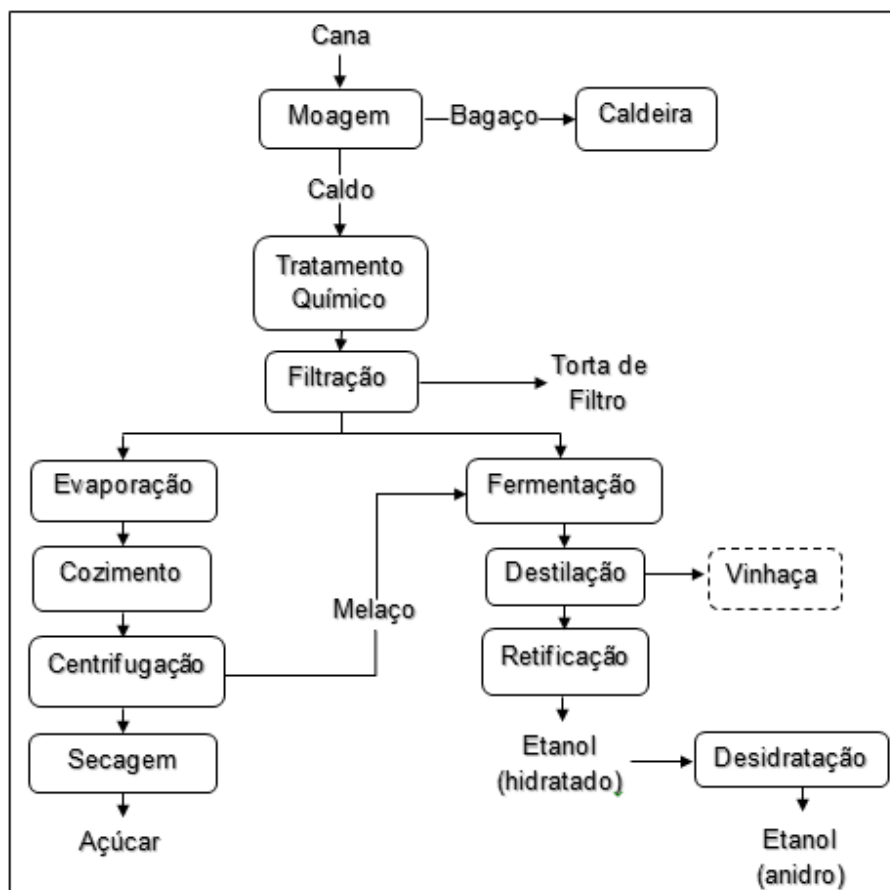


**Figura 2.1-** Matriz energética brasileira e mundial (Fonte: MME, 2013)

A participação das energias renováveis na matriz energética brasileira é muito maior que na matriz energética mundial (MME, 2013). A produção mundial de biocombustíveis passou de 16 bilhões de litros em 2000 para mais de 100 bilhões de litros em 2010. O Brasil registrou, em 2013, emissão de gases do efeito estufa quase 70 vezes menor do que a média estimada para os demais países (IEA, 2013).

Tendo em vista o aumento crescente da demanda por energia e as preocupações com o suprimento de combustíveis fósseis, tem sido cada vez mais clara a importância dos biocombustíveis e do seu papel em reduzir a dependência do petróleo e os efeitos negativos provocados ao meio ambiente. Os combustíveis renováveis convencionais, ou de primeira geração produzidos no Brasil, como o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar, tem sido importantes para mitigação dos impactos ambientais, sociais e econômicos. O desenvolvimento de tecnologias avançadas para a produção de etanol é uma tendência que se observa no mundo, e tem como principal característica a busca pela utilização de todo potencial energético disponível nas diversas biomassas (SANTOS et al., 2013).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na safra de 2013/2014 foram moídas aproximadamente 650 milhões de toneladas (UNICA, 2014) para produção de açúcar e etanol (primeira geração), sendo o bagaço de cana, o principal resíduo lignocelulósico oriundo da indústria sucroalcooleira. Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 280 kg de bagaço (50% de umidade) (PANDEY et al., 2000; CTC, 2012). A Figura 2.2 representa um fluxograma sintético da produção de açúcar e etanol de cana.



**Figura 2.2** – Fluxograma da produção de açúcar e etanol

Há 39 anos, no dia 14 de novembro de 1975, através do decreto nº 76.593 é criado no Brasil o Proálcool, o maior e mais bem sucedido programa mundial de substituição em larga escala dos combustíveis veiculares derivados de petróleo pelo álcool produzido a partir da cana-de-açúcar, o etanol. Em 1973, o mundo passou pela primeira crise do petróleo, o preço do barril subiu absurdamente, gerando enormes prejuízos na economia de todo o mundo. O Brasil também sofreu as consequências desta crise, que impediu a continuidade do seu desenvolvimento econômico depois de cinco anos muito promissores. Entre 1968 e 1973, o país viveu um momento muito positivo na economia, o chamado Milagre Econômico, que colocou o Brasil entre as economias mais desenvolvidas do planeta. Receoso com o momento, o governo brasileiro resolveu lançar o Programa Nacional do Álcool, o Proálcool. Criado pelos engenheiros Lamartine Navarro Júnior e Cícero Junqueira Franco e pelo empresário Maurílio Biagi, o programa contava com os projetos do físico José Walter Bautista Vidal e do engenheiro Urbano Ernesto Stumpf que desenvolveram o motor a álcool. O objetivo era substituir gradativamente a frota de carros movida por combustíveis fósseis por motores que funcionavam com um combustível renovável. Uma tecnologia brasileira e pioneira que tornou

o país menos dependente da gasolina importada e reduziu em dez milhões o número de carros movidos a gasolina que circulavam pelas ruas e estradas do Brasil. Na metade da década de 80, época em que o preço do petróleo baixava e o do açúcar subia, o Programa começou a ruir, pois o álcool combustível passou a ser menos vantajoso economicamente para o consumidor e para o produtor. Por conta disso, o combustível renovável começou a faltar regularmente nos postos e até as montadoras de automóveis, passaram a desacreditar no projeto. O ressurgimento do álcool combustível, o etanol, aconteceu com o desenvolvimento da tecnologia flex, ou seja, carros aptos a rodar tanto com etanol quanto com gasolina, e com a mistura em qualquer proporção dos dois combustíveis. Desde o início do Proálcool até hoje, o etanol substitui cerca de 2,3 bilhões de barris de gasolina, o equivalente a mais de 470 bilhões de litros de etanol (NOVACANA, 2014).

Entre 2004 e 2010, as companhias do setor sucroenergético fizeram grandes investimentos, mais de 100 novas plantas industriais foram construídas e o número de unidades produtoras em operação superou 400 empresas. Apesar de tudo isso, o setor vive atualmente a pior crise de sua história. A perda de competitividade do etanol promoveu uma reversão no ciclo virtuoso de investimento e crescimento da indústria. Entre 2008 e 2013, mais de 70 usinas já fecharam as portas somente na região Centro-Sul e estima-se que outras 12 unidades irão encerrar suas atividades em 2014. A reversão do cenário atual somente será alcançada a partir de uma política de longo prazo consistente, com a valorização de uma matriz energética diversificada e que reconheça as contribuições ambientais do etanol e da bioeletricidade (NOVACANA, 2014).

### **2.1.1 Etanol 1ª geração**

Dentre os vários combustíveis de fontes renováveis 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).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, o maior exportador mundial, líder internacional da tecnologia de produção, a primeira economia do globo a atingir o uso sustentável dos biocombustíveis (DUARTE, LOURENÇO e RIVEIRO, 2006). No que diz respeito ao mercado internacional, a demanda por etanol de cana-de-açúcar tende a crescer, se mantido o atual modelo do mandato norte-americano para biocombustíveis. Além dos EUA, outros países colocam em prática o uso de etanol na matriz energética e o déficit entre a oferta

e a demanda mundial desse produto tende a manter o Brasil como seu principal fornecedor (NOVACANA, 2014).

### **2.1.2 Etanol 2ª geração**

O processo de produção de etanol no Brasil ocorre pela via de fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar e gera como resíduos a vinhaça, a palha e o bagaço, os quais são parcialmente utilizados através da queima para geração de energia (vapor e elétrica) e para adubação das áreas de plantio. Parte considerável deste subproduto não é utilizada, e causa transtornos e problemas no que se refere à sua destinação e processamento (SILVA et al., 2009). O Brasil possui uma vasta e diversificada gama de substratos que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis e bioprodutos. Em relação à biomassa residual de composição lignocelulósica, o país possui um grande potencial, tendo no bagaço de cana de açúcar sua maior representatividade, não só pelas quantidades geradas, mas também, no que tange à facilidade logística. A disponibilidade desse resíduo nas usinas/destilarias o coloca como uma excelente matéria-prima para a produção de biocombustíveis e bioprodutos de segunda geração (PEREIRA et al., 2008).

A produção de etanol de segunda geração é obtida através da transformação dos materiais lignocelulósicos, que se destacam como fontes energéticas, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, em etanol. Uma tonelada de cana contém a energia equivalente a 1,2 barris de petróleo, sendo que cerca de 1/3 dessa energia está armazenada quimicamente no caldo (açúcares) e o restante na biomassa de cana: metade no bagaço e metade na palha, aproximadamente. A produção de etanol através da utilização de resíduos lignocelulósicos pode representar um adicional significativo de 15% na produção (GOES, 2008), porém ainda é oneroso, pois a bioconversão de lignocelulose em etanol envolve numerosos processos (KODAMA et al., 2013; ALKASRAWI et al., 2013). A corrida para industrializar as tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósica voltada à obtenção de biocombustíveis tem sido intensa, com a grande expectativa de produção de cerca de 250 milhões de galões de etanol em 2011. Porém, a produção não ultrapassou 6,8 milhões de galões de biocombustíveis de segunda geração (STEPHEN et al., 2012). Os gargalos tecnológicos ainda existentes dificultam o escalonamento do processo, aumentando os riscos de implantação dessa tecnologia. Stephen et al. (2012) estimaram que o custo econômico envolvido na tecnologia de etanol de segunda geração pela rota bioquímica é ainda mais alto do que a produção tradicional de etanol a partir de milho.

## 2.2 Processos da Fermentação alcoólica

O processo de fermentação foi originalmente desenvolvido por Firmino Boinot nas usinas na região de Melle, França, durante a década de 30 (AMORIM e LOPES, 2004). A partir da década de 70, com início do Proálcool, diversas melhorias neste processo foram introduzidas nas usinas. Estes avanços permitiram às destilarias brasileiras alcançar rendimentos fermentativos de 92-93% em relação ao rendimento teórico por Gay-Lussac (100% de rendimento corresponde a 1g de glicose transformada em 0,511g de etanol e 0,489g de CO<sub>2</sub>). Dentre estas melhorias destacam-se a seleção de leveduras industriais, mudanças nas condições do processo de fermentação como o controle da contaminação bacteriana, o teor de levedo no vinho, a geometria das dornas, a condução do processo propriamente dito, assim como, os avanços na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar (AMORIM, 2006). Além disso, as análises químicas e microbiológicas possibilitaram um melhor controle dos processos de produção de álcool, reduzindo as perdas e melhorando o desempenho do setor (AMORIM et al., 2008).

São denominados “biorreatores”, “reatores bioquímicos”, ou ainda, “reatores biológicos”, os reatores químicos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”, os quais podem ser enzimas ou células vivas. Um reator biológico pode ser operado de forma descontínua, com um inóculo por tanque ou por sistema de cortes, semicontínua, descontínua alimentada ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação celular (SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001).

A escolha entre processo contínuo ou em batelada para produção de etanol por fermentação tem suscitado muita discussão ultimamente. Tradicionalmente as destilarias e usinas brasileiras usam o sistema descontínuo ou de batelada alimentada, processo que começa a enfrentar concorrência do modelo contínuo. No Brasil, o sistema de batelada é considerado mais confiável por muitos engenheiros, por apresentar sistema de assepsia melhor. Não há estatísticas exatas, mas os pesquisadores acreditam que hoje o processo contínuo seja responsável pela produção de 25% a 30% do etanol fabricado no Brasil – o sistema batelada (industrialmente denominado batelada, porém mais corretamente definido como batelada alimentada) domina o mercado das operações fermentativas. Algumas usinas voltaram ao processo batelada após alguns anos de operação contínua. Quando se faz açúcar e álcool, o sistema mais aceito pelos técnicos é o batelada, porém o assunto está longe de ser esgotado, o que exige ainda muito estudo de Engenharia e Cinética da Fermentação Alcoólica (ALCOOLBRÁS, 2006).

### **2.2.1. Processo descontínuo - Batelada**

O processo descontínuo simples pode ter uma descrição típica do tipo: prepara-se certo meio de cultura que seja adequada à nutrição e desenvolvimento do microrganismo, bem como o acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um biorreator (fermentador); adiciona-se o microrganismo responsável pelo processo biológico e se aguarda que o processo ocorra. Após um determinado tempo de fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto. Este processo é o mais seguro quando se tem problema de manutenção e condições de assepsia, pois ao final de cada batelada imagina-se que o reator deva ser esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, o qual poderá sofrer todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001).

Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto. A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO e SATO, 2001a).

O biorreator batelada será sempre usado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001).

O método de operação em batelada simples na fermentação alcoólica na área industrial se restringe a pequenas fábricas de aguardente, porém é de grande valia nos estudos em laboratório.

### **2.2.2. Batelada Alimentada**

Os processos batelada alimentada nas suas várias modalidades têm se mostrado eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em



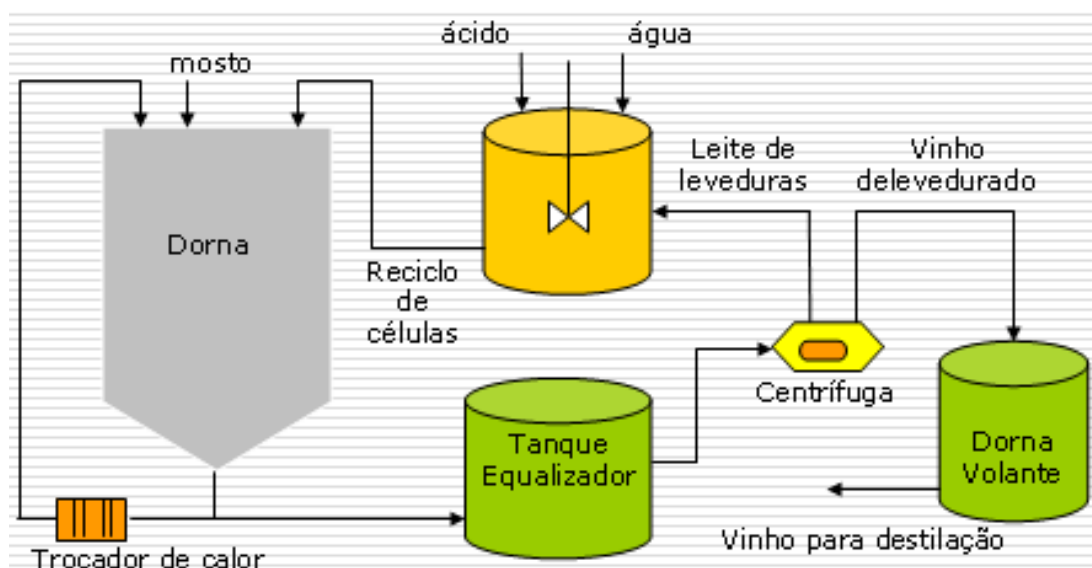
fermentação. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a adição do mesmo nos momentos mais propícios durante a fermentação (MCNEIL e HARVEY, 1990).

O processo batelada alimentada, também conhecido como Melle-Boinot na fermentação alcoólica, é um processo onde o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume do biorreator. Foi desenvolvido com o intuito de aumentar a produtividade em relação à batelada, que tem baixa produtividade e é lenta. Algumas vantagens podem ser citadas, como: economia de açúcar para reprodução celular, maior rendimento em etanol, eliminação de contaminantes pela centrifugação do meio fermentado e reciclo do fermento (VIEGAS, 2003; BORGES, 2008). Este processo apesar de antigo é muito conveniente e satisfatório quanto à operação e eficiência de conversão de açúcares a álcool (ZARPELON e ANDRIETTA, 1992).

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001b).

Com o objetivo de alcançar altas concentrações de produto, são necessárias altas concentrações de células viáveis no fermentador por longos períodos de tempo e isso é impossível no processo batelada a volume constante e no contínuo. Uma técnica comum nas indústrias de fermentação é primeiro atingir uma alta concentração de células no fermentador batelada e então deslocar o metabolismo da célula, tal que ela produza o produto bioquímico desejado. Essa alteração pode ser efetuada interrompendo o crescimento celular e adicionando precursores do produto bioquímico, dentre outras alterações. Esse processo é utilizado no reator em batelada alimentada (MCNEIL e HARVEY, 1990).

A representação esquemática de um reator ou dorna operando em batelada alimentada na produção de etanol é apresentada na Figura 2.3.



**Figura 2.3** - Representação esquemática de uma dorna operando em batelada alimentada com recirculação de fermento (Fonte: RIBEIRO, 2010).

A operação de uma dorna segue a seguinte rotina: após adição do fermento à dorna, etapa denominada inoculação, pelo emprego de fermento novo na partida ou reciclo de fermento tratado no processo em operação, o mosto é alimentado ao inóculo segundo uma vazão determinada. Na maioria dos processos de fermentação alcoólica industriais do Brasil, o tempo em que a dorna é alimentada (tempo de enchimento) é da ordem de 5 horas. Após o enchimento da dorna, o processo continua por batelada simples até o consumo total do açúcar. Durante todo o processo fermentativo, batelada alimentada e batelada simples, ocorre o controle da temperatura do processo pela circulação do mosto em fermentação através de trocador de calor externo. Após o consumo total do açúcar, o vinho é encaminhado a um tanque equalizador (tanque pulmão ou dorna volante das centrífugas), sendo a seguir enviado às centrífugas de fermento. Nestas, são separadas duas correntes, uma de vinho delevedurado e outra de fermento. O vinho delevedurado é direcionado à etapa de destilação e o fermento ou leite ou creme de levedura vai para as cubas de tratamento de fermento, onde é diluído até em torno de 35% de fermento em volume e sofre tratamento ácido, sendo então reciclado para uma outra fermentação. Normalmente se usam três cubas de tratamento ácido operando em série. Via de regra se empregam numa unidade industrial um número de dornas de fermentação compatível com a produção desejada, de tal forma que elas operam segundo um cronograma de trabalho otimizado, sendo que em dado momento cada dorna se encontra num estágio de operação diferente, visando manter um fornecimento uniforme de vinho ao setor da destilaria (RIBEIRO, 2010).

Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO e SATO, 2001b). Desse modo é mantida uma concentração de açúcar no fermentador num valor baixo, não ocorrendo inibição da fermentação pelo substrato, fenômeno comum numa operação em batelada simples (RIBEIRO, 2010).

### **2.2.3. Processo Contínuo**

O processo de fermentação contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001).

Num processo contínuo de fermentação alcoólica, fatores como pH, temperatura, concentração de sacarose e álcool, concentração de biomassa, viabilidade celular dentre outros, influenciam na produtividade do sistema, requerendo assim, maior controle sobre o processo (SIQUEIRA, 1993; ATALA et al., 2000).

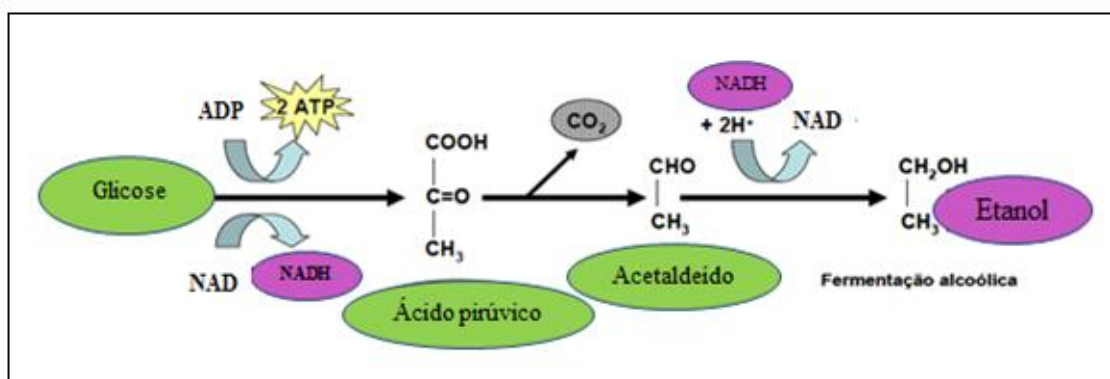
Algumas vantagens observadas na condução dos processos contínuos frente aos outros processos de produção de etanol podem ser citadas como (ANDRIETA, 1994; ALVES, 1996; BORGES, 2008; PACHECO 2010): maior produtividade devido à ausência de parada para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação e também pelas células estarem mais adaptadas ao meio, menor volume de equipamentos em geral, redução do consumo de insumos de uma maneira geral, menor necessidade no emprego de mão de obra. Contudo, como pontos negativos podem ser citados (FACCIOTTI, 2001): possibilidade maior de contaminação, possibilidade de ocorrências de mutações genéticas espontâneas e seleção de mutantes menos produtivos, dificuldades de operação em estado estacionário como formação de espumas e crescimento de microrganismo na parede do reator ou nos sistemas de entrada e saída do produto, dificuldade de manutenção da homogeneidade no reator quando se trabalha com vazões baixas e maior investimento fixo na planta.

Segundo Finguerut et al. (2008), no caso específico da fermentação alcoólica, o processo batelada alimentada é robusto, flexível e relativamente fácil de operar e o processo contínuo é mais barato, menos robusto e menos flexível.

De acordo com Amorim (2006), o rendimento da fermentação alcoólica é maior no processo batelada alimentada e os gastos com antibióticos e ácido são maiores no processo contínuo.

### 2.3 Bioquímica da fermentação alcoólica

Os agentes da fermentação mais eficientes e empregados industrialmente na produção de etanol são as leveduras. Na literatura a fermentação alcoólica conduzida por estes microrganismos já é um processo amplamente conhecido. Sabe-se que é um processo anaeróbico no qual ocorre a transformação de açúcares em etanol,  $\text{CO}_2$  e outros produtos, pela utilização de catalisadores biológicos, ou seja, enzimas. Bioquimicamente, a fermentação é a oxidação incompleta do açúcar, gerando como subproduto um composto orgânico oxidável. A sacarose sofre hidrólise pela enzima invertase, sendo convertida em glicose e frutose. Ambas entram na via glicolítica e, através de uma sequência de reações, são convertidas a piruvato. Este, primeiramente é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído e liberando  $\text{CO}_2$ . Posteriormente o acetaldeído é reduzido a etanol, sendo essa reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase (*ADH*) (MISSAWA, 2009). A Figura 2.4 mostra um fluxograma simplificado da conversão da glicose a etanol.



**Figura 2.4** - Fluxograma simplificado da conversão de glicose a etanol.

(Fonte: GALASSI, 2007)

Globalmente, a fermentação alcoólica pode ser entendida como a transformação de açúcares em etanol e pode ser traduzida pela seguinte reação, onde  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  representa uma hexose, que no caso da fermentação de mostos derivados da cana de açúcar representa a glicose e a frutose.



O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia, através da síntese de adenosina trifosfato (ATP) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e  $\text{CO}_2$  resultantes constituem tão somente em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (LIMA, et al., 2001).

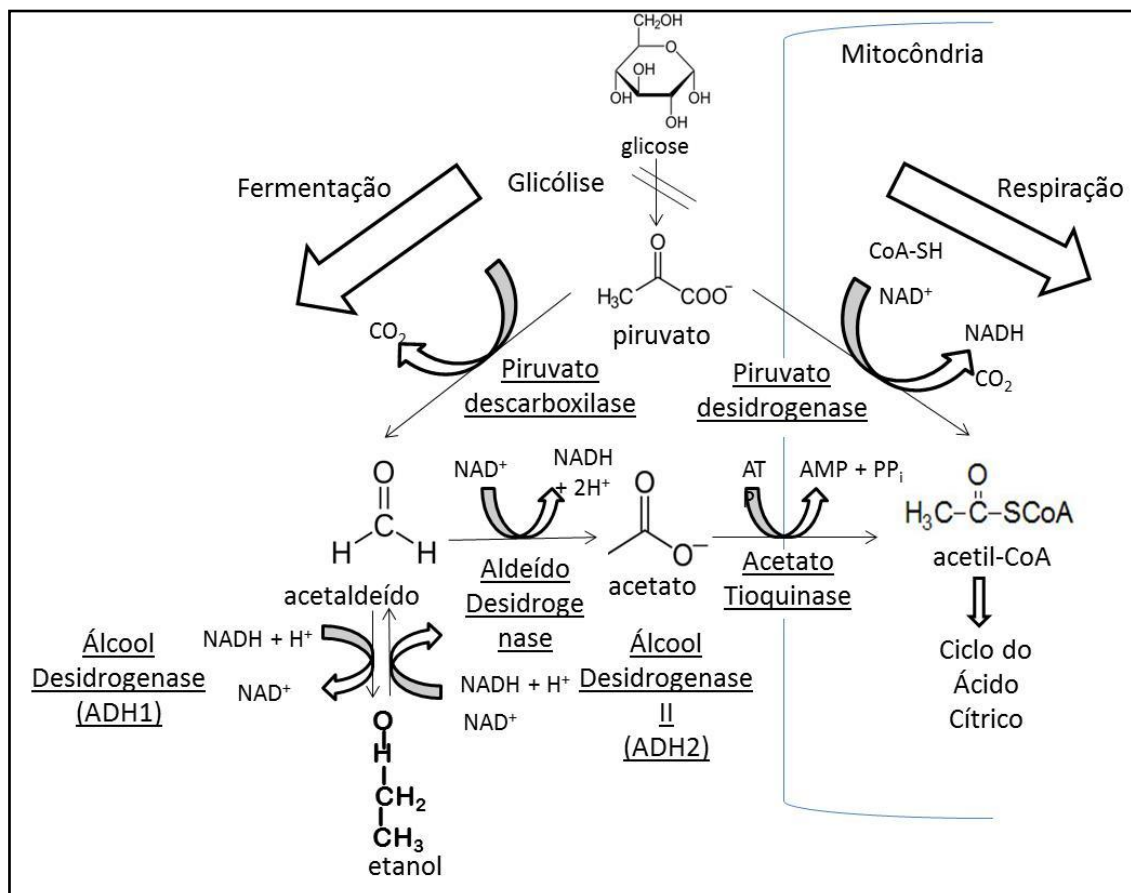
De acordo com a estequiometria, a conversão de 1 g de glicose deveria produzir 0,51 g de etanol e 0,49 g de dióxido de carbono. Na prática, o rendimento teórico não é atingido devido à utilização de uma parte da glicose para a produção de glicerol e álcoois superiores, aldeídos, ésteres e acetatos entre outros produtos conhecidos como subprodutos da fermentação, além de parte do açúcar ser direcionado ao crescimento da levedura (OURA, 1974; LURTON et al., 1995).

Duas moléculas de ATP produzidas na glicólise são usadas na condução da biossíntese das leveduras, que envolve diversas biorreações que requerem energia. Portanto, a produção de etanol está fortemente relacionada com o crescimento das leveduras, o que significa que leveduras devem ser produzidas como subproduto. Sem o consumo contínuo de ATP pelo crescimento celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido imediatamente, em razão do acúmulo intracelular de ATP, que inibe a fosfofrutoquinase, uma das mais importantes enzimas reguladoras da glicólise (GALASSI, 2007).

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).

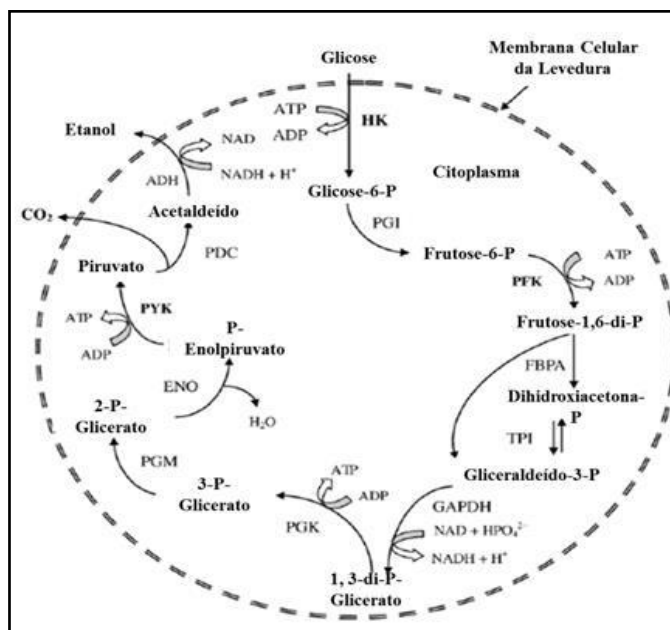
Do ponto de vista bioquímico, a fermentação alcoólica consiste na conversão da hexose em etanol. Por meio da enzima invertase essas hexoses, glicose e frutose são obtidas pela quebra da sacarose presente no caldo de cana. Durante o transporte para dentro das

células, essas hexoses são fosforiladas entrando na glicólise, processo finalizado com a formação do piruvato, conforme Figura 2.5 (CUNHA, 2004).



**Figura 2.5** – Esquema da fermentação e da respiração (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 glicólise, através da qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas, tal como ilustrado na Figura 2.6.



**Figura 2.6**– Rota metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BAI et al., 2008)

A principal rota metabólica envolvida na fermentação etanólica é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Sob condições anaeróbias, o piruvato é convertido a etanol com desprendimento de  $\text{CO}_2$ . A transformação do açúcar (glicose) em etanol e dióxido de carbono envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. (BAI et al., 2008).

## 2.4 Fatores que influenciam na fermentação alcoólica

Diversos fatores físicos (temperatura e pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem, concentração da levedura e contaminação bacteriana), afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Dentre esses fatores, os mais frequentemente mencionados são os altos teores alcoólicos, a temperatura elevada, a acidez do meio, a presença de sulfito, a contaminação bacteriana e mais raramente documentada, a contaminação com leveduras não *Saccharomyces* (BASSO, 2004).

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

- Obtenção do máximo rendimento em etanol;
- Minimização na síntese de outros produtos (como glicerol e ácido láctico);
- Minimização do tempo de fermentação;
- Baixa contaminação bacteriana (ações preventivas, como tratamento ácido do fermento);
- Manutenção da alta viabilidade do fermento;
- Minimização de produtos químicos (como ácidos, antibióticos e antiespumante);
- Minimização dos gastos com manutenção (como limpeza e vazamentos);
- Minimização de gastos de energia e água;
- Automatização das operações manuais (como medidas e controles de temperatura, brix e pH).

#### **2.4.1 Levedura**

As leveduras são os agentes biológicos ativos responsáveis pela fermentação alcoólica e, por isso, a escolha da linhagem apropriada é de importância fundamental para o êxito da fermentação. São definidas como fungos especializados, monocelulares, desclorofilados. Do aspecto das exigências nutricionais esse grupo situa-se entre aqueles que se desenvolvem em substratos mais simples, constituídos por fontes de carbono e sais minerais, do que aquele que exige meios mais complexos (MENEZES, 1980).

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias, entre as quais a *Zymomonas mobilis*, são tidas como capazes de produzir etanol, mas economicamente as leveduras ainda são os agentes largamente utilizados (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O gênero *Saccharomyces* é um dos grupos de microrganismos mais estudados pela comunidade científica. Esse interesse é função da ampla aplicação desses microrganismos na indústria de biotecnologia. Essa levedura tem sido relatada como agente de transformação desde 1800 (ANDRIETTA, STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006).

Entre os diversos desafios da seleção de leveduras estão os processos de fermentação com alto teor alcoólico (acima de 16% etanol v/v). Atualmente, os programas de seleção de



leveduras têm permitido obter cepas mais tolerantes e apropriadas para fermentações com alto teor alcoólico. Tal processo abre uma nova perspectiva de trabalho para as usinas brasileiras no sentido de reduzir custos, melhorar a eficiência energética e diminuir o impacto ambiental (AMORIM et al., 2011).

As leveduras, quando fermentando em condições estressantes, mostram queda da viabilidade celular, aumento na formação de glicerol, redução na formação de biomassa e diminuição nos conteúdos celulares de glicogênio e trealose, sendo que tais parâmetros são de extrema utilidade para a identificação de linhagens tolerantes a um único ou a um conjunto de fatores estressantes (ALVES, 1994; BASSO, 2004).

#### **2.4.2 Temperatura**

As temperaturas ótimas para a produção industrial situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol (LIMA et al., 2001).

O rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas (15 a 20°C), porém apresentam altos tempos de fermentação. Quando a temperatura do biorreator é de 25°C a 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, mas em temperaturas maiores que 35°C decresce a viabilidade celular (TORIJA et al., 2003).

Segundo Menezes (1980), a faixa de temperatura recomendada está entre 25 e 36°C. Temperaturas inferiores ao limite retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam a evaporação do álcool e favorecem o aparecimento de contaminações. Em fermentações que são realizadas a baixas temperaturas a atuação de bactérias contaminantes fica muito enfraquecida, assim sua multiplicação e também a produção de ácidos ficam com taxas menores. Isso, além de influir em ganhos acentuados no rendimento fermentativo, promove a eliminação de um dos fatores causadores de floculação das leveduras, com suas consequências desagradáveis, pois, sabe-se, que quando ocorre floculação o processo fica instável, prejudicando principalmente a centrifugação, e facilitando o aumento da contaminação. A temperatura adequada deve ser mantida na fermentação por meio de dispositivos para o resfriamento de dornas. Fermentações alcoólicas conduzidas a temperaturas mais baixas podem levar a uma maior resistência da levedura ao teor final de etanol e também a uma menor geração de subprodutos do metabolismo celular, devido ao menor estresse a que as células estão submetidas (LORA e VENTURINI, 2012).

O aumento da temperatura de fermentação produz uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de etanol no meio e nas células (STECKELBERG, 2001). A toxidez do etanol sobre as leveduras se acentua 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).

É observada uma maior produção de álcoois superiores em temperaturas mais altas. Tal comportamento pode ser explicado pelo menor crescimento das leveduras em temperaturas mais elevadas conforme observado por Gutierrez (1991); assim, os cetoácidos não sendo utilizados para a síntese de aminoácidos, seriam convertidos em álcoois superiores.

O controle industrial da temperatura das dornas de fermentação é um aspecto difícil, principalmente nas regiões de clima mais quente, especialmente no verão, pois a temperatura ambiente é muito próxima ou superior àquela do processo. Desta forma, uma alternativa que tem sido bastante citada é o uso dos equipamentos que utilizam o ciclo de refrigeração por absorção (chillers) de brometo de lítio, utilizando como fonte primária de energia vinhaça quente ou outras fontes baratas de vapor (DIAS et al., 2012).

A condução da fermentação alcoólica em temperaturas mais baixas leva a produção de um vinho com maior teor de etanol, pois a resistência das leveduras a ele é aumentada. Assim, há uma série de vantagens relacionadas à tecnologia de fermentação com menores temperaturas, tais como redução do volume de vinhaça produzida, menor consumo de vapor na destilação, menor consumo de água, menor gasto de ácidos e antibióticos devido à menor contaminação bacteriana. Um dos gargalos a ser vencido ainda é o aumento da produtividade.

### 2.4.3 pH

As fermentações alcoólicas se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, porém a faixa ótima se situa entre 4 e 5,5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA et al., 2001).

Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de se restringir o crescimento do fermento, com a consequente redução da produção de glicerol e de contaminação bacteriana. Entretanto, fermentações alcoólicas se desenvolvem bem em níveis mais elevados de pH como melaços (pH 5,8 a 5,9). Já os caldos de cana fermentam sem correção de acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6,8. No processo

com reutilização da levedura, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2, durante uma ou duas horas, visando à redução da carga microbiana. Desta forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA et al., 2001).

Segundo Lima (2001), a tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais. Monaco (2007) afirma que a utilização de linhagens de *S. cerevisiae* resistentes ao estresse ácido é uma característica importante para a indústria de álcool combustível. Valores muito baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, segundo Gomes (1988), aumentam a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO<sub>2</sub>.

#### 2.4.4 Nutrientes

As células de levedura, durante o processo de fermentação alcoólica apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente a multiplicação e o crescimento celular e também a eficiência da transformação do açúcar em álcool (AMORIM, 2005). 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). A fermentação alcoólica envolve reações catalisadas por enzimas, em sequência ordenada, que ocorrem no citoplasma celular. Essas enzimas sofrem ações de diversos fatores como nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH, temperatura e outros, que podem favorecer ou não o desempenho das leveduras. 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).

Os nutrientes tem papel importante na obtenção de um bom rendimento industrial para fermentação alcoólica. O caldo de cana por natureza possui sais minerais. Entretanto suas quantidades variam em função do solo, clima e período do ano. Desta forma, torna-se necessário a suplementação adequada de alguns elementos para obtenção de uma fermentação satisfatória. O fósforo é um suplemento essencial, pois favorece a ação das leveduras e aumenta a eficiência e produtividade do processo fermentativo. Outro elemento importante no

metabolismo da levedura é o nitrogênio. Os nutrientes metálicos também apresentam grande importância no processo fermentativo, uma vez que são responsáveis pelo bom desempenho das reações enzimáticas (VASCONCELOS, 1987).

Segundo Camili, et al.,(2006), a concentração adequada de nutrientes é de suma importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo. A falta de nutrientes pode acarretar negativamente o rendimento alcoólico e a viabilidade celular da levedura.

#### **2.4.5 Subprodutos**

Além de etanol e de CO<sub>2</sub>, vários subprodutos também são produzidos durante a fermentação de etanol. Glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação alcoólica é produzido principalmente em resposta para reparar danos e proteger as estruturas moleculares quando submetidas a condições de estresse. Outros subprodutos, tais como os ácidos orgânicos e outros álcoois são produzidos em níveis menores. A produção destes subprodutos, bem como o crescimento de células de levedura, inevitavelmente diminui a produção de etanol (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008; MELO, 2006).

Durante a fermentação alcoólica são formados mais de uma centena de ácidos orgânicos, sendo sua origem dependente de três vias do metabolismo da levedura. Um determinado número de compostos como acetato, succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, malato e citrato derivam diretamente do piruvato pelo funcionamento limitado do ciclo do ácido tricarboxílico (BARRE et al., 2004).

O ácido succínico é o ácido orgânico de maior expressão gerado durante a fermentação alcoólica. As razões fisiológicas que levam a levedura à sua produção e excreção ainda são discutíveis; admite-se que sua formação se deva a um meio fermentativo inadequado, pois não há evidência de necessidade metabólica desse ácido pela levedura na proporção em que é produzido. Entretanto, sua formação e excreção parece conferir às leveduras maior competitividade com as bactérias contaminantes numa fermentação industrial (LIMA, et al., 2001).

A formação dos álcoois superiores depende de vários fatores como pH, concentração de açúcares, tipo de levedura utilizada, condições de temperatura, nível de aeração, entre outros. Os principais álcoois superiores sintetizados durante a fermentação alcoólica são o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol, o 1,2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol e o feniletanol (BARRE et al., 2004).

## 2.5 Fermentação com alto teor alcoólico

A fermentação com alto teor alcoólico foi inicialmente proposta para a indústria cervejeira em meados da década de 80 e logo após sugerida para a produção de álcool combustível a partir de cereais. Atualmente, as fermentações industriais no país trabalham com teores alcoólicos de aproximadamente 8 a 8,5%. Em média, para cada litro de álcool produzido são gerados outros 12 litros de vinhaça o que representa cerca de 290 bilhões de litros de vinhaça por ano. O processo de fermentação com alto teor alcoólico visa não só o aumento da produção de etanol, como também possui vantagens técnica, econômica e ambiental. O grande interesse por essa tecnologia reside na redução dos custos de produção do etanol: menor investimento de capital, redução dos custos de mão de obra e energia por litro de etanol produzido, redução no consumo de água, facilidades de limpeza e sanitização, melhor assepsia, etc (THOMAS et al., 1996).

Dobrar o teor alcoólico nas fermentações significa reduzir pela metade o volume de vinhaça. O grande gargalo tecnológico em relação à geração de vinhaça está na fermentação, portanto é preciso aplicar esforços e investimentos em praticas de fermentação e no desenvolvimento de leveduras, que permitam elevar os teores alcoólicos dos mostos fermentados. Para cada aumento percentual no teor alcoólico do vinho haverá uma correspondente redução percentual no volume de vinhaça produzido (FINGUERUT et al., 2008).

Apesar dos diversos avanços na fermentação industrial nos últimos 30 anos, o teor alcoólico das fermentações tem sofrido poucas mudanças. Diferentemente de outros processos fermentativos ao redor do mundo, como ocorre com a produção de álcool a partir do milho nos Estados Unidos e Canadá, as destilarias brasileiras reciclam centenas de toneladas de levedo a cada fermentação. Isso aumenta o rendimento industrial e diminui o tempo de fermentação por se iniciar cada ciclo fermentativo com concentrações elevadas de levedo nas dornas. Por outro lado, o levedo deve estar com viabilidade elevada para poder ser reciclado. Um dos fatores responsáveis pela perda da viabilidade da levedura é a elevação do teor alcoólico. Por essa razão, o desafio tem sido subir o teor alcoólico sem comprometer a viabilidade do levedo. A fermentação com alta concentração de levedura 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,

utilizando altas concentrações de sacarose, na ordem de 250 g/L, obtém mais de 15% (v/v) de etanol. A tecnologia utilizando altas concentrações de sacarose foi proposta por diversos autores na década de 90 (WANG et al., 1999; BAI et al., 2004).

Entre os principais benefícios da fermentação alcoólica com alto teor alcoólico estão: a redução do volume de vinhaça pela metade, economia com transporte da mesma até as áreas de ferti-irrigação, economia de energia (vapor) que pode ser empregada para co-geração de energia elétrica, economia de insumos (ácido sulfúrico e antibacteriano), economia de água circulando no processo e redução do número de centrífugas pela metade (AMORIM et al., 2011).

Esse processo capaz de aumentar o teor alcoólico nas fermentações possui potencial de reduzir em até 50% o volume de vinhaça gerado pelas destilarias no país. Isso representa uma redução de 140 bilhões de litros de vinhaça por ano. Ou seja, a cada aumento de 1% no teor alcoólico da fermentação, tem-se uma redução de aproximadamente 17 bilhões de litros de vinhaça por ano. Colocando essa economia de produção de vinhaça em valores, ultrapassam R\$ 500 milhões de economia no setor agrícola com distribuição de vinhaça. O uso da vinhaça na irrigação e fertilização da lavoura trouxe benefícios com sua disposição no solo associada à economia de custos em insumos e em fertilizantes químicos. A grande problemática atual é o grande volume produzido que fica muito acima da demanda dos solos fertiirrigados, propiciando prejuízos ambientais com o descarte, fator solucionado pelo processo de alto teor alcoólico (AMORIM et al., 2011).

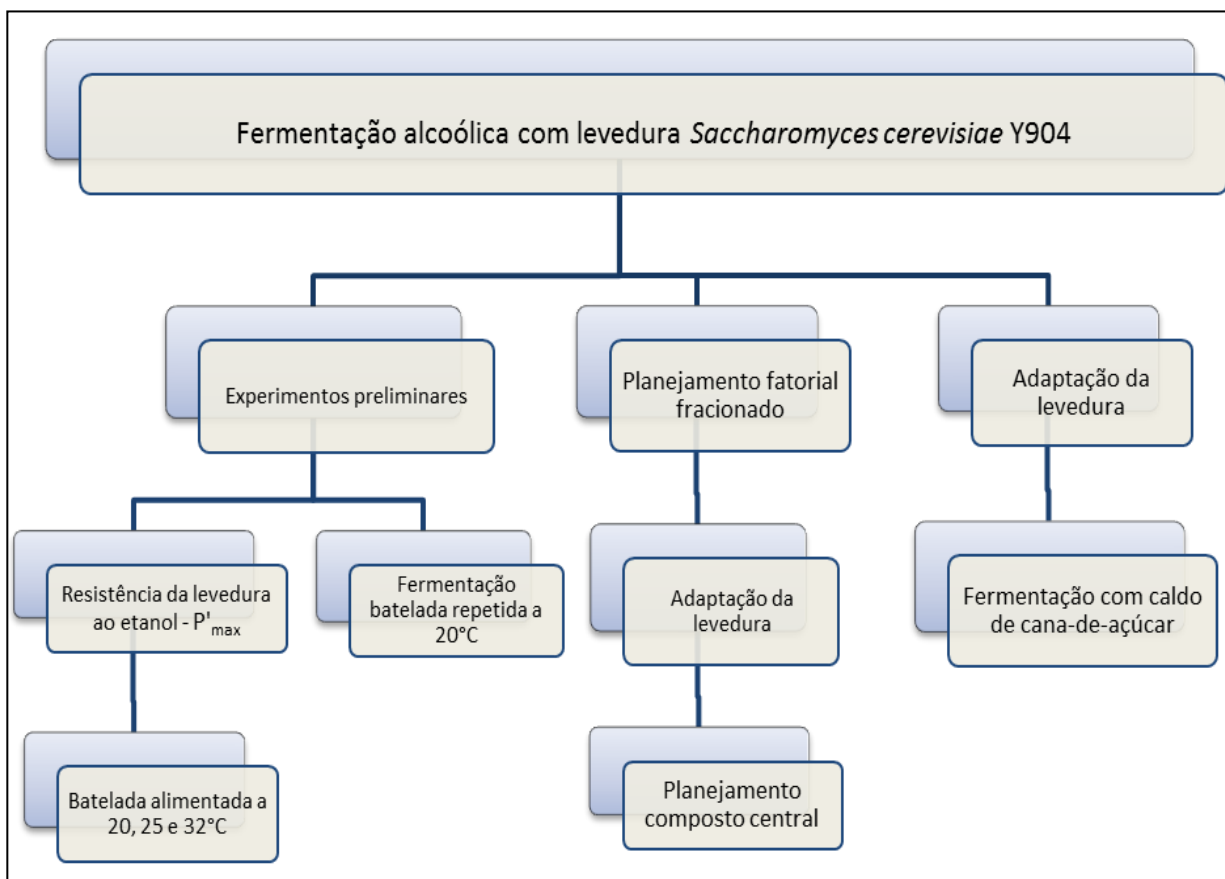
---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

---

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados no desenvolvimento experimental desta dissertação, bem como a metodologia empregada para cada etapa. O fluxograma da Figura 3.1 representa as etapas realizadas neste trabalho.



**Figura 3.1** - Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Microrganismo

Utilizou-se uma cepa industrial Y-904 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na forma granulada, produzida pela AB Brasil. Na preparação do inóculo utilizou-se uma massa pré-determinada de levedura para cada experimento. O volume do inóculo correspondeu a 30% do volume total do meio. O volume total de cada fermentação foi 1,5 L, sendo 0,45 L de

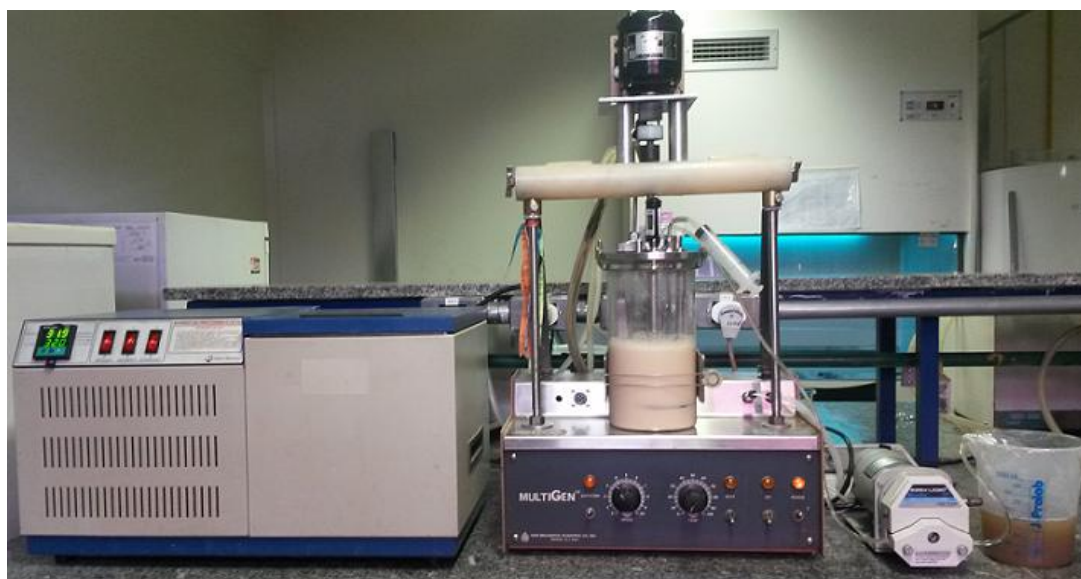
inóculo. A hidratação das leveduras foi realizada por duas horas em água à temperatura ambiente e sob agitação em shaker.

### 3.1.2 Meio de cultura

O meio de cultura para as leveduras foi composto de sacarose (variável para cada experimento),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1,67 g/L), KCl (1 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, exceto a sacarose, que foi açúcar cristal comercial. Para alguns experimentos foi utilizado como meio de cultura caldo de cana-de-açúcar.

### 3.1.3 Unidade experimental

Os experimentos foram realizados em um fermentador modelo New Brunswick Multigen, com controles de agitação e de temperatura operado em batelada alimentada, com volume útil de 1,5 L, sendo este volume utilizado nas fermentações. O volume de inóculo representava em todas as fermentações 30% do volume útil e o meio de cultura 70%. Ao iniciar-se a alimentação do reator eram acrescidos 1,05 L de meio com tempos de enchimento e concentração do substrato na alimentação conforme experimentos propostos. A alimentação foi realizada por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex<sup>®</sup>, modelo n° 7553-76). A Figura 3.2 ilustra o reator New Brunswick Multigen operando em batelada alimentada.



**Figura 3.2** – Fermentador New Brunswick Multigen operando em batelada alimentada.



## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Determinação das concentrações de açúcares e etanol

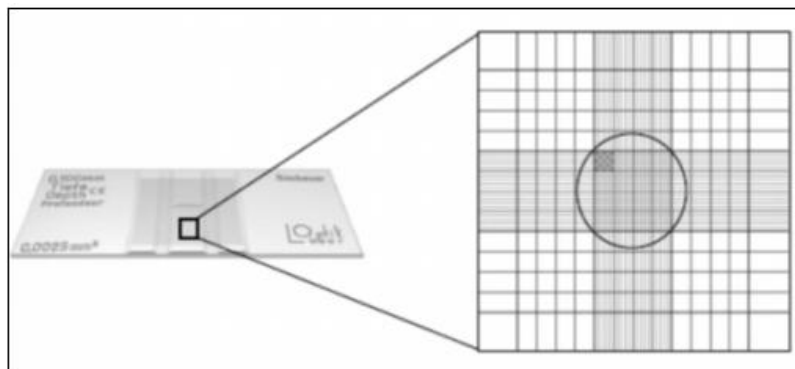
O etanol, os açúcares totais (glicose, frutose e sacarose) e o glicerol foram quantificados pelo método de cromatografia de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquide Chromatography*) ilustrado na Figura 3.3. Essa técnica cromatográfica é utilizada para separar uma mistura de compostos em análises químicas e bioquímicas com a finalidade de identificar, quantificar ou purificar os componentes individuais da mistura. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico de marca *Shimadzu* modelo *LC-20A Proninence*, coluna *Supelcogel-Ca*, na qual os açúcares, glicerol e etanol foram detectados por índice de refração (RID). A solução de arraste utilizada foi solução aquosa de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0,1%), com fluxo de bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32°C e volume de injeção de 20 microlitros. Os valores obtidos nos cromatogramas foram calculados com o auxílio de curvas padrão.



**Figura 3.3** – HPLC utilizado nas análises de ácidos e açúcares.

### 3.2.2 Determinação da viabilidade celular

Para determinação da concentração celular das amostras utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Olympus). A câmara possui 25 quadrículos, considerou-se para contagem 5 quadrículos que possuem 16 retículos com uma área de 0,0025 mm<sup>2</sup> e profundidade de 0,1 mm para cada quadrículo, conforme Figura 3.4. Com isso tem-se um volume total da câmara de 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µL.



**Figura 3.4** – Câmara de NeuBauer (BARGA, 2007).

Para a contagem das células, utilizou-se a técnica de coloração de azul de metileno (JONES, 1981). Este corante apresenta coloração azul na forma oxidada, tornando-se incolor na forma reduzida. Neste método as células viáveis permanecem não coradas enquanto as não viáveis coram de azul. Diluiu-se a amostra, adicionaram-se algumas gotas do azul de metileno e promoveu-se a homogeneização. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70%. Realizou-se a contagem das células em microscópio óptico com um aumento de 100 vezes. O cálculo da concentração de célula foi realizado de acordo com a Equação 3.1 (MADIGAN et al., 2004).

$$Células \left( \frac{células}{mL} \right) = \frac{n^{\circ} \text{ células totais} \times \frac{1}{\text{volume do retículo}} \times \text{diluição}}{n^{\circ} \text{ retículos}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.2.3 Determinação da biomassa

Para acompanhar o crescimento celular, foi utilizado método espectrofotométrico. De posse da curva de calibração relacionando massa seca com absorbância (Apêndice A.1). Desta forma foi determinada a concentração celular em termos de massa seca por unidade de volume.

### 3.3 Cálculos relacionados às fermentações

#### 3.3.1 Rendimento

O rendimento em grama de etanol por grama de açúcar redutor total inicial ( $ART_i$ ), considerando o rendimento teórico de  $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$  como 100%, foi determinado pela Equação 3.2 .

$$Y_{P/S} = \frac{C_{\text{etanol}_f}}{0,511 * C_{\text{ART}_i}} * 100\% \quad (3.2)$$

Em que:

$Y_{P/S}$  = rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos (%);

$C_{\text{etanol}_f}$  = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

$C_{\text{ART}_i}$  = concentração de açúcar redutor total inicial (g/L).

#### 3.3.2 Produtividade

O cálculo da produtividade, em relação ao etanol produzido, é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção. A produtividade foi calculada pela Equação 3.3.

$$Pr_{\text{etanol}} = \frac{C_{\text{etanol}_f}}{t} \quad (3.3)$$

Em que:

$Pr_{\text{etanol}}$  = produtividade do etanol (g/ L.h);

$C_{\text{etanol}_f}$  = concentração de etanol (g/L) ao final da fermentação;

$t$  = tempo final de fermentação (h).

### 3.4 Experimentos preliminares

#### 3.4.1 Resistência da levedura ao etanol – $P'_{\text{max}}$

O objetivo da determinação de  $P'_{\text{max}}$  foi quantificar a máxima concentração de etanol que a levedura foi capaz de produzir durante o processo de fermentação alcoólica, até que o etanol formado começasse a inibir a levedura, cessando assim a formação de mais produto. Os

experimentos para determinar a resistência da levedura ao etanol foram realizados em batelada alimentada nas temperaturas de 20, 25 e 32°C, com pH inicial ajustado em 4,5, inóculo de 9 % v/v e volume final de 1 litro. Nas fermentações realizadas em batelada alimentada, a alimentação do açúcar cristal, sem diluição e sem nutrientes, foi feita quando no reator a concentração de açúcares era próxima de zero. As quantidades de sacarose adicionadas em cada alimentação estão descritas na Tabela 3.1. O total de ART alimentado correspondeu a uma concentração de 315 g/L se o reator fosse operado em batelada com volume útil de 1,0 L.

**Tabela 3.1** – Massa de sacarose adicionada ao meio

<b>Alimentação</b>	<b>Massa de ART (g)</b>
Início	150
1ª Alimentação	55
2ª Alimentação	55
3ª Alimentação	55

### **3.4.2 Fermentação Batelada repetida a 20°C**

Os ensaios experimentais foram realizados em batelada repetida, por três vezes no mini- fermentador, modelo New Brunswick Multigen conduzida a 20°C, com pH inicial ajustado em 4,5, concentração inicial de ART de 189,5 g/L e inóculo de 30 % v/v, sem qualquer adaptação da levedura nesta temperatura. Ao final de cada fermentação, o meio foi centrifugado a 5000 rpm e o fermento decantado foi utilizado para outras fermentações.

### **3.5 Adaptação da levedura**

Com o intuito de adaptar a levedura à temperaturas mais baixas, visando maior produtividade quando submetidas á temperaturas estudadas no PCC e de se avaliar a viabilidade da mesma ao longo de vários processos fermentativos, foram realizadas sucessivas fermentações em shaker com controle de temperatura a 4°C e agitação de 120 rpm, em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL do mesmo meio de cultura do item 3.1.2, porém com concentração de sacarose de 100 g/L e 7,5 g da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em cada frasco. O fechamento dos frascos foi feito com rolha de algodão para permitir a saída

do CO<sub>2</sub>, produzido durante a fermentação, conforme Figura 3.5. Após 48 horas, tempo necessário para que a levedura consuma todo substrato adicionado ao meio, os microrganismos foram recuperados por centrifugação. Inicialmente e após o tempo de incubação, que foi de 48 horas, foram analisadas as concentrações celulares obtidas por contagem em câmara de Neubauer e por massa seca.



**Figura 3.5** – Adaptação da levedura por fermentações em shaker.

### 3.6 Planejamento fatorial fracionado

Com o propósito de obter experimentos significativos e confiáveis, utilizou-se um tratamento estatístico dentro de um planejamento fatorial fracionado para selecionar dentre quatro variáveis, três mais significativas no processo para a produção de etanol no processo em batelada alimentada.

As variáveis escolhidas para o planejamento foram: temperatura ( $X_1$ ), concentração celular ( $X_2$ ), concentração de ART ( $X_3$ ) e tempo de enchimento do reator ( $X_4$ ). As respostas para o planejamento efetuado foram: produtividade, rendimento de etanol e concentração de açúcar total residual.

Neste planejamento foi estabelecido o nível superior com o sinal +1 das variáveis escolhidas para o planejamento, sendo a temperatura 32°C, tempo de enchimento 10 horas, concentração celular 30 g/L e concentração de ART 322 g/L. O nível inferior das variáveis escolhidas foi representado por -1 sendo a temperatura 24°C, tempo de enchimento 2 horas,

concentração celular 3 g/L e concentração de ART 180g/L. Os valores adotados foram escolhidos conforme revisão da literatura e testes preliminares.

Os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados pela Equação 3.4.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.4)$$

Sendo,

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

$X$  = valor da variável a ser calculada;

$X_0$  = valor da variável no ponto central;

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

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

As equações de codificação da temperatura ( $X_1$ ), concentração celular no inóculo ( $X_2$ ), concentração de substrato na alimentação - ART ( $X_3$ ) e tempo de enchimento do reator ( $X_4$ ) estão apresentadas pelas Equações 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8 respectivamente.

$$X_1 = \frac{(T_0 - 28)}{4} \quad (3.5)$$

$$X_2 = \frac{(X_0 - 16,5)}{13,5} \quad (3.6)$$

$$X_3 = \frac{(S_0 - 251)}{71} \quad (3.7)$$

$$X_4 = \frac{(t_{ench.} - 6)}{4} \quad (3.8)$$

A Tabela 3.2 mostra a matriz de planejamento utilizada. A escolha da região ótima foi realizada utilizando a técnica de superfície de respostas.

**Tabela 3.2** - Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  para os experimentos realizados - valores reais e codificados.

	Valor Real (Valor Codificado)			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
Experimento	Temperatura (°C)	Concentração celular (g/L)	Concentração de ART (g/L)	Tempo de enchimento (h)
1	24 (-1)	3 (-1)	180 (-1)	2 (-1)
2	32 (+1)	3 (-1)	322 (+1)	2 (-1)
3	24 (-1)	3 (-1)	322 (+1)	10 (+1)
4	32 (+1)	3 (-1)	180 (-1)	10 (+1)
5	24 (-1)	30 (+1)	322 (+1)	2 (-1)
6	32 (+1)	30 (+1)	180 (-1)	2 (-1)
7	24 (-1)	30 (+1)	180 (-1)	10 (+1)
8	32 (+1)	30 (+1)	322 (+1)	10 (+1)
9	28 (0)	16,5 (0)	251 (0)	6 (0)
10	28 (0)	16,5 (0)	251 (0)	6 (0)
11	28 (0)	16,5 (0)	251 (0)	6 (0)

### 3.7 Planejamento Composto central

Foi realizado um Planejamento Composto Central (PCC): fatorial completo  $2^3$ , incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, utilizando-se o software *Statistica 7.0*. O objetivo deste PCC foi de analisar a influência conjunta da concentração de substrato (ART) na alimentação, concentração celular do inóculo e temperatura. O alfa de rotabilidade utilizado neste planejamento experimental foi de 1,6818. O tempo de enchimento do reator batelada alimentada foi de 5 horas para todos os experimentos, o pH do meio foi ajustado em 4,5, as amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 2 h e foi realizada também uma adaptação da levedura, conforme item 3.5 por duas vezes consecutivas (por períodos de 48 horas) à temperatura de 4°C. O inóculo, com concentração variável de células, definida pelo planejamento experimental, foi preparado

diluindo-se a suspensão de microrganismos obtida na adaptação referida acima. Para o preparo do inóculo, efetuava-se a centrifugação dessa suspensão de leveduras em tubo graduado, sendo possível então conhecer a concentração volume/volume de microrganismos na suspensão. Conhecida essa concentração, utilizava-se a regra de diluição ( $C_1.V_1=C_2.V_2$ ), em que o volume e concentração finais eram conhecidos, e determinava-se o volume de suspensão de leveduras necessário para que fosse produzido um inóculo na concentração celular desejada, utilizando uma curva padrão que relaciona absorbância com concentração celular em termos de massa seca (Apêndice A.1). Procedimento análogo para determinação das concentrações celulares em g/L foi feito para as demais concentrações celulares no inóculo, e está indicado na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** - Relação entre concentrações celulares no inóculo e no reator

<b>Conc. de Leveduras no Inóculo</b>	<b>Conc. Inicial no Reator</b>
(g/L)	(g/L)
30,0	10,0
45,0	15,0
67,5	22,5
90,0	30,0
105,0	35,0

Os ensaios experimentais foram realizados de acordo com o planejamento experimental utilizado. As variáveis independentes foram a temperatura que variou de 24 a 34°C, a concentração celular do inóculo que foi de 10 a 35 g/L e a concentração de substrato na alimentação (ART) que variou de 179,6 a 280,5 g/L. Estes valores foram definidos com base no planejamento fatorial fracionado.

Na Tabela 3.4 estão apresentados os valores atribuídos às três variáveis independentes no planejamento experimental, sendo a variável  $X_1$  a temperatura (°C),  $X_2$  a concentração celular no inóculo (g/L) e  $X_3$  concentração de substrato na alimentação - ART (g/L).



**Tabela 3.4** – Matriz do Planejamento Composto Central do efeito da temperatura, concentração celular e concentração de substrato na alimentação (ART)

Experimentos	Valor Real (Valor Codificado)		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
	Temperatura (°C)	Concentração celular (g/L)	ART (g/L)
1	26 (-1)	15 (-1)	200 (-1)
2	26 (-1)	15 (-1)	260 (+1)
3	26 (-1)	30 (+1)	200 (-1)
4	26 (-1)	30 (+1)	260 (+1)
5	32 (+1)	15 (-1)	200 (-1)
6	32 (+1)	15 (-1)	260 (+1)
7	32 (+1)	30 (+1)	200 (-1)
8	32 (+1)	30 (+1)	260 (+1)
9	24 (-α)	22,5 (0)	230 (0)
10	34 (+α)	22,5 (0)	230 (0)
11	29 (0)	10 (-α)	230 (0)
12	29 (0)	35 (+α)	230 (0)
13	29 (0)	22,5 (0)	179,6 (-α)
14	29 (0)	22,5 (0)	280,5 (+α)
15	29 (0)	22,5 (0)	230 (0)
16	29 (0)	22,5 (0)	230 (0)
17	29 (0)	22,5 (0)	230 (0)

As equações de codificação da temperatura (X<sub>1</sub>), concentração celular no inóculo (X<sub>2</sub>) e concentração de substrato na alimentação - ART (X<sub>3</sub>) estão apresentadas pelas Equações 3.9, 3.10 e 3.11, respectivamente e foram obtidas utilizando a Equação 3.4.

$$X_1 = \frac{(T_0 - 29)}{3} \quad (3.9)$$

$$X_2 = \frac{(X_0 - 22,5)}{7,5} \quad (3.10)$$

$$X_3 = \frac{(S_0 - 230)}{30} \quad (3.11)$$

Após a realização do planejamento experimental foi realizada uma análise da região ótima de trabalho pelas superfícies de respostas e efetuou-se a validação do ponto escolhido nessa região com o objetivo de testar a reprodutibilidade dos modelos obtidos.

### **3.8 Experimentos de Validação**

O modelo obtido após o ajuste foi validado em duas condições diferentes utilizando a faixa ótima obtida para a maximização do rendimento. A primeira fermentação de validação foi realizada utilizando a levedura adaptada conforme item 3.5 por duas vezes, assim como foi feito para todo o PCC, e a segunda fermentação utilizando a levedura adaptada por dez vezes.

### **3.9 Fermentações com caldo de cana-de-açúcar**

Após a realização do procedimento de adaptação da levedura descrito no item 3.5 por dez vezes, foi realizado duas fermentações, uma a 24°C e outra a 32°C, usando como meio de cultura caldo de cana-de-açúcar (com e sem correção da concentração de ART), concentração celular de 30 g/L e corrigindo o pH do inóculo para 2,5, que é o pH inicial em fermentações alcoólicas industriais. Para verificar qual variável, pH ou adaptação, tem maior influência na eficiência da fermentação, foi realizada uma fermentação a 24°C com caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura, sem acertar o pH do inóculo.

---

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

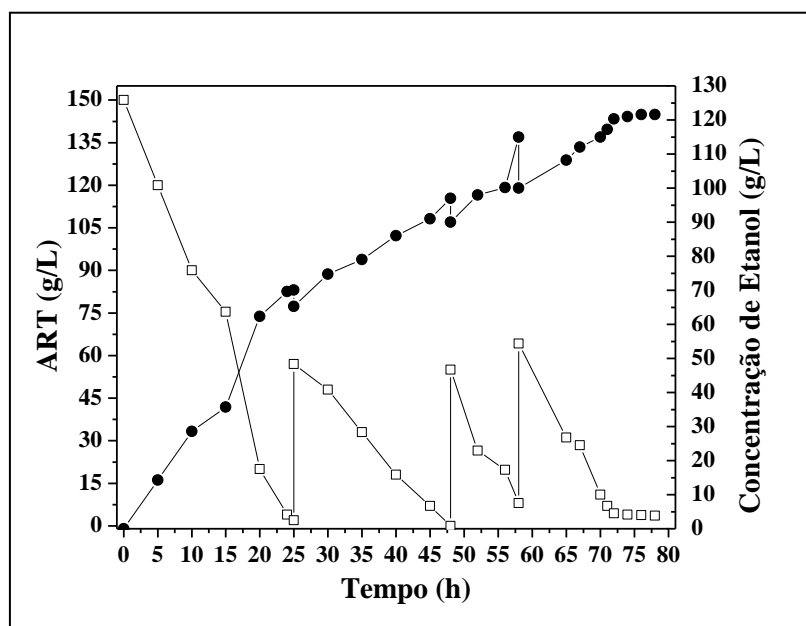
---

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados e discussão dos experimentos preliminares de resistência da levedura ao etanol –  $P'_{\max}$ , realizados a 20, 25 e 32°C em batelada alimentada e da viabilidade da levedura após sucessivas fermentações em batelada a 20°C. Posteriormente foi realizada uma adaptação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 para utilização da mesma em um planejamento fatorial fracionado e em um planejamento composto central. E para finalizar foi realizada uma maior adaptação da levedura para efetuar fermentações com caldo de cana-de-açúcar.

#### **4.1 Influência da temperatura na resistência ao etanol da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904**

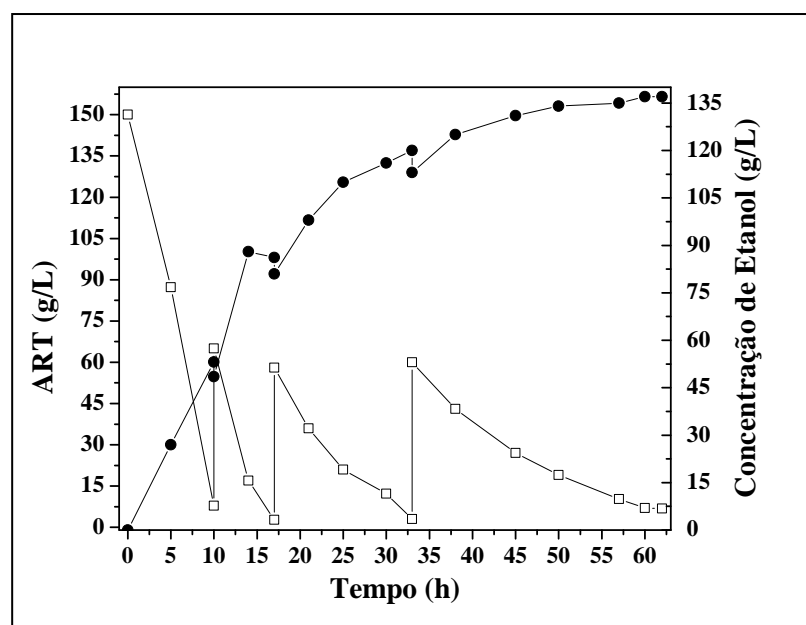
##### **4.1.1 Batelada alimentada**

A fim de se obter concentrações mais elevadas de etanol no caldo fermentado foram realizados experimentos nas temperaturas de 20, 25 e 32°C, em batelada alimentada. O açúcar foi adicionado ao reator sempre que a concentração de açúcar chegava a valores mínimos. Nesses experimentos, a levedura usada não sofreu qualquer processo de adaptação. Após completar o volume do reator por batelada alimentada, a concentração de sacarose correspondeu a 300 g/L se o processo fosse operado em batelada convencional. Na Figura 4.1, os resultados obtidos a 20°C, indicaram um tempo de fermentação de aproximadamente 72 horas e teor alcoólico de 15°GL.



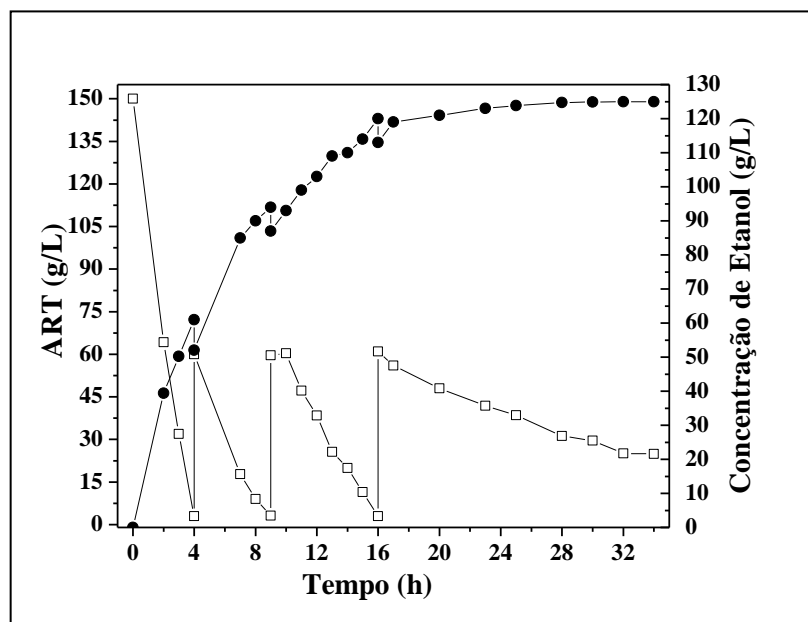
**Figura 4.1** - Perfis de concentração de sacarose (◻) e concentração de etanol (●) em função do tempo, para experimento conduzido em batelada alimentada a 20 °C.

Para a fermentação realizada a 25 °C, representada na Figura 4.2, o tempo de fermentação foi de 60 horas, o teor de alcoólico atingiu 17,36°GL.



**Figura 4.2** - Perfis de concentração de sacarose (◻) e concentração de etanol (●) em função do tempo, para experimento conduzido em batelada alimentada a 25 °C.

A fermentação conduzida a 32°C conforme Figura 4.3, apresentou tempo de fermentação de 32 horas, a produção máxima de etanol chegou a 124 g/L, correspondendo a 15,7°GL.



**Figura 4.3** - Perfis de concentração de sacarose (□) e concentração de etanol (●) em função do tempo, para experimento conduzido em batelada alimentada a 32 °C.

Estes resultados indicam que a levedura usada neste estudo, que é também utilizada industrialmente na produção de etanol, possui uma boa tolerância ao etanol na faixa de temperaturas estudada. Os tempos de fermentação foram bastante elevados, mas estratégias de alimentação no processo em batelada alimentada é uma variável que também foi estudada neste trabalho. As concentrações de etanol obtidas neste estudo, utilizando esta estratégia de batelada alimentada, podem ser consideradas como parâmetro para a tolerância ao etanol na modelagem cinética na respectiva temperatura. Podemos observar pelos gráficos que mostram os perfis de concentração de açúcares redutores totais e etanol, dos experimentos conduzidos em batelada alimentada que a produção máxima –  $P'_{max}$  é atingida quando essas concentrações se mantêm constantes. Isso ocorre principalmente quando o etanol formado começa a inibir a levedura, cessando assim a formação de produtos. O parâmetro  $P_{máx}$ , é a concentração máxima de etanol no qual o crescimento de células de levedura e produção de etanol são completamente inibidos (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). As concentrações finais de glicerol foram de 4,5 g/L para a fermentações realizada a 20 e 25°C e de cerca de 10,0 g/L para a fermentação realizadas 32°C, o que indica que a levedura pode

esta sofrendo um possível estresse a essa temperatura mais elevada. Outro aspecto a ser considerado é o elevado valor da concentração de sacarose usada, que foi 300 g/L, em comparação com processo industrial.

Frohman e Orduña (2013), utilizando o processo batelada alimentada na fermentação de um sumo de uvas de alta gravidade por *S. cerevisiae* revelou mudanças fundamentais no que diz respeito à viabilidade e ao estresse sofrido pela levedura. O processo em batelada alimentada resultou ainda numa grande diminuição na produção de glicerol quando comparado ao processo batelada simples.

Guidini (2013) quantificou a máxima concentração de etanol que a levedura C2/00 (cepa floculante de *Saccharomyces cerevisiae*) foi capaz de produzir durante o processo de fermentação alcoólica a 32°C. Após o tempo de 30 horas de fermentação, a levedura sofreu inibição pelo produto, não consumindo mais substrato. A produção máxima de etanol foi de 110 g/L, aproximadamente 13,92% (v/v) e ao final da fermentação não houve crescimento da levedura, mantendo sua concentração inicial (12% v/v).

Foi possível concluir que a cepa Y904 de *Saccharomyces cerevisiae* estudada neste trabalho possui maior resistência ao etanol no processo fermentativo a 32°C em relação à cepa C2/00, para praticamente o mesmo tempo de fermentação.

Oliveira (2008) obteve uma produção máxima de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* de 72,1 g/L e viabilidade celular de 86,4% utilizando inóculo de 40 g/L em massa seca operando em batelada simples a 34°C, utilizando 200 g/L de sacarose inicial.

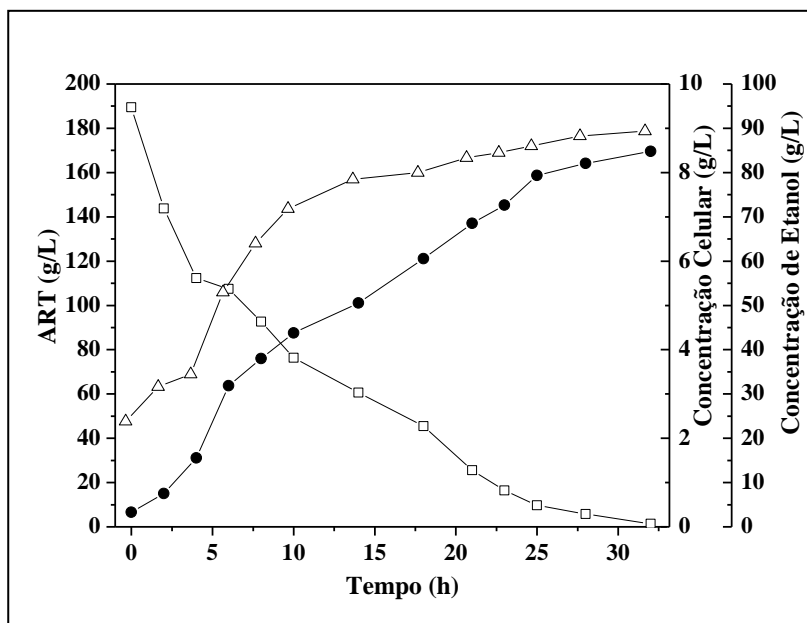
Com os resultados apresentados com a cepa *Saccharomyces cerevisiae* Y904 é possível concluir que, nos processos de fermentação a temperaturas mais baixas, a resistência ao etanol é maior. Outro aspecto evidenciado no processo em batelada alimentada é a possibilidade de se obter concentrações de etanol superiores no caldo de fermentação, quando em comparação com o processo batelada convencional.

Estes resultados evidenciam a importância de se estudar a adaptação da levedura às baixas temperaturas visando diminuir os tempos de fermentação e aumentar a produtividade, objetivando aproveitar as vantagens que o processo batelada alimentada em baixas temperaturas oferece.

#### **4.2 Viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 empregando processo fermentativo em batelada repetida a 20°C**

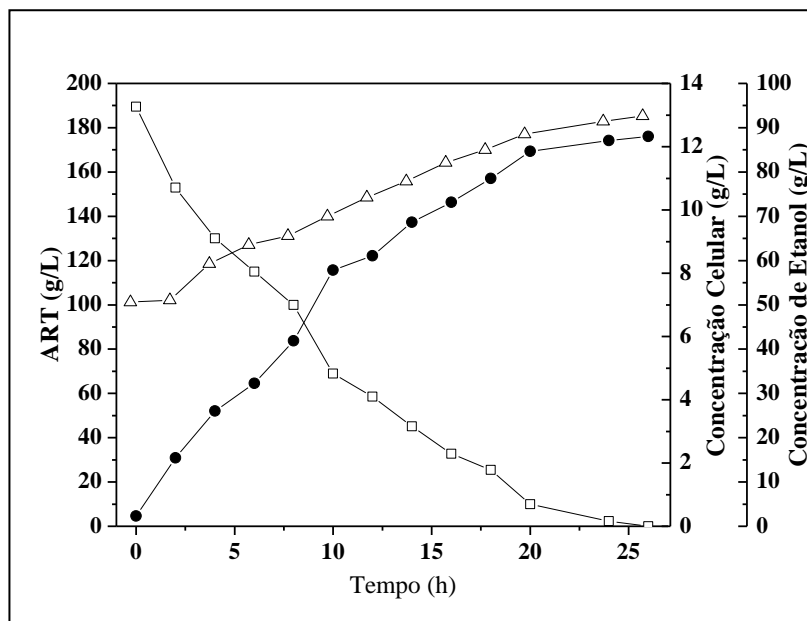
A Figura 4.4 mostra os perfis de concentração de ART, etanol e concentração celular na primeira fermentação conduzida a 20°C, em batelada. A concentração inicial de ART foi

de 189,5 g/L e concentração celular inicial 3 g/L, sem qualquer adaptação da levedura nesta temperatura. Após 33 horas de fermentação, o teor alcoólico atingiu 10,7°GL com um rendimento em etanol de 87,5%. A concentração celular atingiu 8,93 g/L no final da fermentação, com viabilidade celular de 91,89%.



**Figura 4.4** - Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para a 1ª fermentação realizada a 20 °C

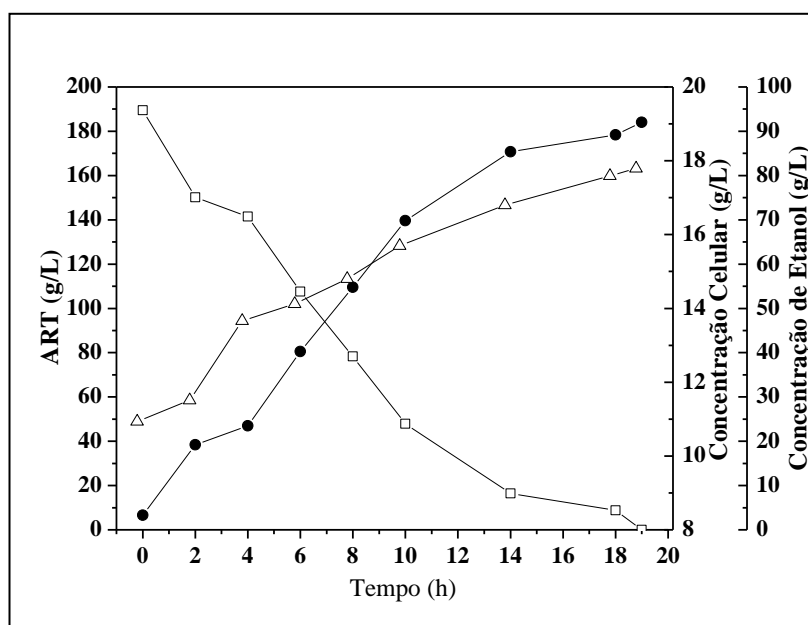
Reutilizando a levedura da primeira fermentação, foi realizada uma segunda fermentação nas mesmas condições experimentais da primeira, cujos resultados são apresentados na Figura 4.5. Com 26 horas de fermentação a concentração de sacarose residual era de aproximadamente 2 g/L, o teor alcoólico de 11,15°GL com um rendimento de 90,8%, obtendo-se uma melhoria em todos os parâmetros em relação à primeira fermentação. A concentração celular também aumentou de 7 para 13 g/L e a viabilidade celular foi de 91,94%, praticamente o mesmo valor daquele da primeira fermentação.



**Figura 4.5** - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART (□), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo, para a 2ª Fermentação realizada a 20°C.

Realizou-se uma terceira fermentação a 20°C, recuperando e reutilizando a levedura centrifugada da segunda fermentação, cujos resultados estão apresentados na Figura 4.6. Com um tempo de fermentação de 19 horas, o teor alcoólico alcançou 11,7°GL com um rendimento de 93,33% e consumo total do açúcar. A viabilidade celular ao final da fermentação foi de 92%. Na sequência do trabalho, foram realizadas sucessivas fermentações nas mesmas condições experimentais das anteriores, recuperando e reutilizando o fermento centrifugado. Na sétima fermentação foi possível chegar ao teor alcoólico de aproximadamente 12%, após 16 horas de fermentação, indicando a possibilidade de se trabalhar com maior teor de etanol no vinho e reciclagem de leveduras, já que a viabilidade se manteve elevada e praticamente constante, em torno de 92%, mesmo depois de sucessivas repetições. Estes resultados foram bastante satisfatórios em relação ao teor alcoólico, rendimento em etanol e viabilidade celular, mantidos após os sucessivos reaproveitamentos da levedura. O tempo de fermentação, a 20°C ainda é elevado se comparado com os atuais tempos de fermentação obtidos em batelada alimentada nas destilarias brasileiras. Um aspecto importante a ser destacado é a possibilidade de reciclar a levedura mesmo com teores alcoólicos acima de 10°GL.





**Figura 4.6** - Perfis de concentração de açúcar redutor total - ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para a 3ª Fermentação realizada a 20°C.

O aumento de 2% do teor alcoólico observado da primeira para a terceira fermentação foi bastante significativo. Segundo dados publicados amplamente pela literatura, a cada 1% de aumento no teor alcoólico obtido no vinho fermentado, é obtida uma redução de 15 bilhões de litros de vinhaça por ano considerando todas as usinas do Brasil (AMORIM, 2011). O tempo de fermentação também é extremamente vantajoso comparado ao etanol de milho, já que para o milho a duração é de 70 horas e para o etanol de cana foram necessárias apenas 16 horas, na temperatura de 20°C, que não é considerada uma temperatura ótima para a levedura. Estes resultados nos permitiram avançar nos estudos em temperaturas mais baixas e avaliar o processo em batelada alimentada.

### 4.3 Planejamento fatorial fracionado

No planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  estudou-se as variáveis que afetam o desempenho da fermentação alcoólica, como a influência da temperatura  $X_1$  (24 - 32°C), concentração celular no inóculo  $X_2$  (3 - 30 g/L), concentração de açúcares redutores totais na alimentação  $X_3$  (180 - 322 g/L) e o tempo de enchimento do reator  $X_4$  (2 - 10 h). A Tabela 4.1 mostra os valores codificados e reais das variáveis de estudo e as respostas rendimento em relação ao valor teórico, produtividade em etanol e sacarose residual.

**Tabela 4.1** - Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  e suas respectivas respostas em 24 horas de fermentação

Experimento	Valor Real (Valor Codificado)				Rendimento (%)	Produtividade (g <sub>etanol</sub> /L.h)	Açúcar Residual (g/L)
	$X_1$ (°C)	$X_2$ (g/L)	$X_3$ (g/L)	$X_4$ (h)			
1	24 (-1)	3 (-1)	180 (-1)	2 (-1)	60,88	2,33	38,00
2	32 (+1)	3 (-1)	322 (+1)	2 (-1)	47,39	3,25	145,00
3	24 (-1)	3 (-1)	322 (+1)	10 (+1)	26,77	1,84	218,13
4	32 (+1)	3 (-1)	180 (-1)	10 (+1)	79,31	3,05	4,72
5	24 (-1)	30 (+1)	322 (+1)	2 (-1)	48,60	3,33	150,00
6	32 (+1)	30 (+1)	180 (-1)	2 (-1)	92,02	9,73	0,00
7	24 (-1)	30 (+1)	180 (-1)	10 (+1)	86,10	5,29	0,00
8	32 (+1)	30 (+1)	322 (+1)	10 (+1)	69,21	4,75	46,72
9	28 (0)	16,5 (0)	251 (0)	6 (0)	74,77	4,08	16,14
10	28 (0)	16,5 (0)	251 (0)	6 (0)	74,02	4,08	15,00
11	28 (0)	16,5 (0)	251 (0)	6 (0)	73,22	4,00	17,00

Todas estas variáveis foram analisadas durante 24 horas de processo fermentativo. Este tempo de fermentação é justificado pelos Experimentos 6 e 7, os quais mostram que decorrido 24 horas de processo fermentativo, o açúcar havia sido consumido. Verifica-se

também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas, indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Com os resultados apresentados na Tabela 4.1, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica*® 7.0.

#### 4.3.1 Rendimento

Foi feita uma análise estatística do comportamento da resposta rendimento, dessa forma, determinou-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações, conforme Tabela 4.2, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. Foi considerado um nível de significância de 95%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que  $p < 0,05$ .

**Tabela 4.2** – Resultados da regressão múltipla para a resposta rendimento, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Efeito	Nível de significância p-valor
Média	63,79	63,79	0,000001
X <sub>1</sub>	8,20	16,40	0,000411
X <sub>2</sub>	10,20	20,40	0,000214
X <sub>3</sub>	-15,79	- 31,58	0,001468
X <sub>4</sub>	1,56	3,12	0,000058
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-1,56	- 3,12	0,044745
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	2,11	4,22	0,020638
R <sup>2</sup> = 0,998			

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.1 completa com todos os parâmetros significativos com  $p < 0,05$ .

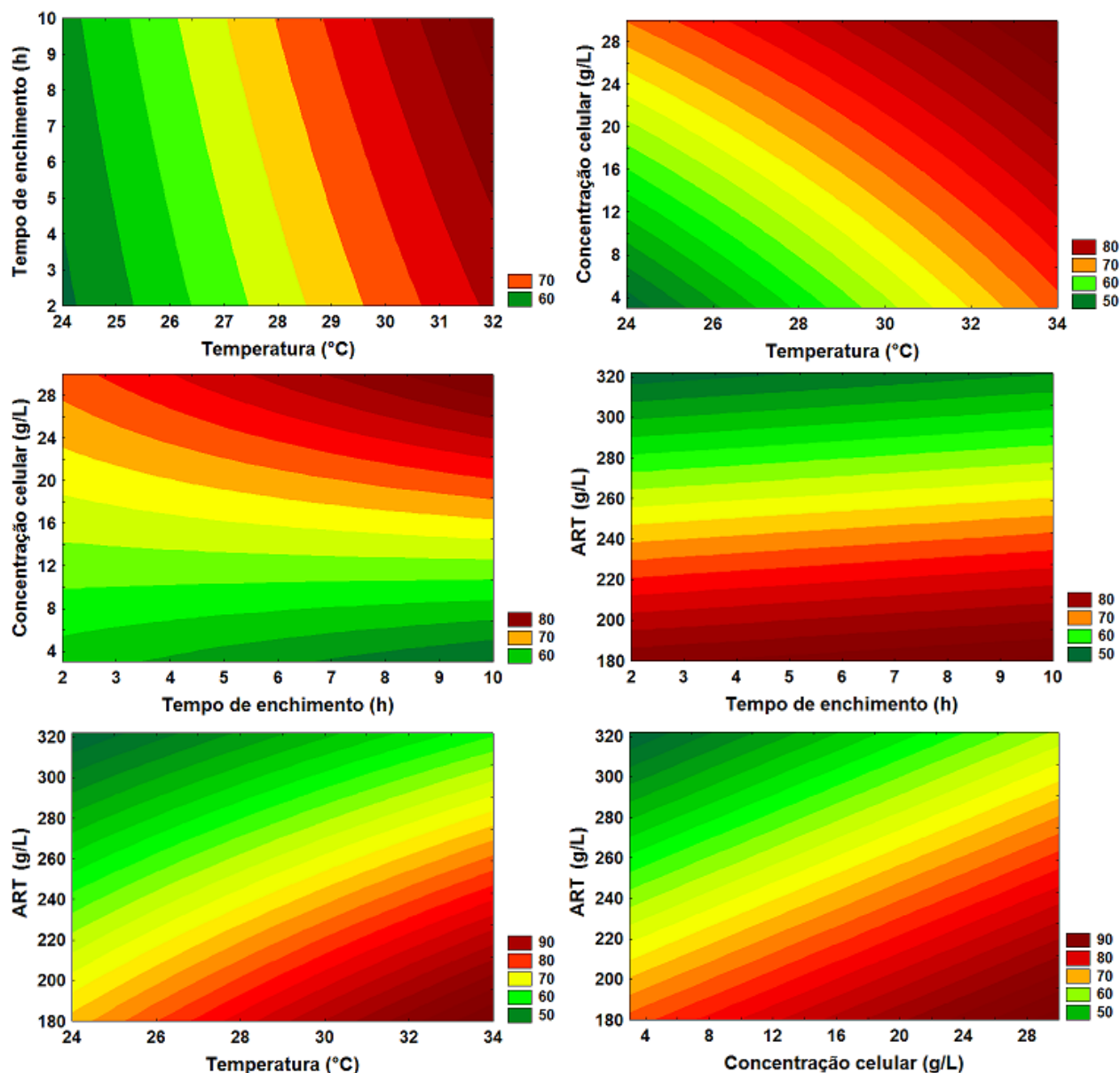
$$Y_{P/5}(\%) = 63,78 + 8,20X_1 + 10,20 X_2 - 15,79X_3 + 1,56X_4 - 1,56X_1X_2 + 2,11 X_1X_4 \quad (4.1)$$

Pela Tabela 4.2, pode-se notar que o efeito da variável X<sub>3</sub> apresentou menor contribuição para o aumento do rendimento. No tempo de 24 horas avaliado no planejamento

fatorial nota-se que as menores concentrações de açúcares redutores na alimentação indicam um maior rendimento, pois nestes experimentos já se tem o final da fermentação, enquanto nos experimentos de maiores concentrações de açúcares ainda necessitaram de um maior tempo para o consumo do substrato. Já o tempo de enchimento do reator - variável  $X_4$ , com menor efeito, mostra não ter grande influência no aumento do rendimento.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,998, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da resposta rendimento, mostrando que 99,8% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.7 ilustra as curvas de contorno das quatro variáveis de processo apresentadas graficamente duas a duas para a resposta rendimento.

Pela Figura 4.7 observa-se rendimentos maiores para concentração de sacarose variando de 180 – 240 g/L, concentração celular no inóculo maior que 20 g/L até a faixa avaliada de 30 g/L, e temperatura na faixa de 26 a 32°C. O aumento do rendimento nos maiores tempos de enchimento é explicado pelo fato das células sofrer pouca ou nenhuma inibição pela concentração elevada de substrato. A utilização de reatores operando em batelada alimentada é particularmente muito importante para os processos fermentativos, pois ameniza a inibição do crescimento dos microrganismos e a repressão catabólica (SENGUPTA e MODAK, 2001; ASTOLFI et al., 2011).



**Figura 4.7** - Curvas de contorno para a resposta rendimento avaliando as variáveis temperatura, concentração celular no inóculo, concentração ART na alimentação e tempo de enchimento do reator duas a duas.

Guidini et al. (2013), com a cepa C2/00 obteve rendimento de 93,9%, utilizando 153 g/L de ART, concentração celular de 15 g/L, tempo de enchimento do reator de 6 horas e temperatura do processo fermentativo de 32°C. Para esta mesma fermentação foi obtido produtividade de 4,27  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$  e restou ao final de 10,5 horas de fermentação 56,3 g de sacarose residual.

Fazendo uma comparação com o planejamento fatorial fracionado, o experimento 6, realizado na mesma temperatura, 32°C, foi o que resultou maior rendimento (92%), porém

inferior ao obtido por Guidini. Este valor de rendimento inferior pode ser explicado pelo tempo de enchimento que foi de 2 horas, em que tempos de enchimento menores podem gerar uma inibição nas células pela elevada concentração de substrato alimentado. A produtividade do experimento 6 foi maior (9,76 g<sub>etanol</sub>/L.h) consumindo totalmente o substrato em 10 horas de fermentação.

### 4.3.2 Produtividade

Analisando estatisticamente o comportamento da resposta produtividade pela Tabela 4.1, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos, conforme Tabela 4.3, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

**Tabela 4.3** - Resultados da regressão múltipla para a resposta produtividade com todas as variáveis e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Efeito	Nível de significância p-valor
Média	4,196	4,196	0,000015
X <sub>1</sub>	0,998	1,996	0,000257
X <sub>2</sub>	1,580	3,160	0,000103
X <sub>3</sub>	-0,905	- 1,81	0,000313
X <sub>4</sub>	-0,466	- 0,932	0,001178
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,466	0,932	0,001178
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0,291	- 0,582	0,003014
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	-0,832	- 1,664	0,000371
R <sup>2</sup> = 0,999			

Após a regressão múltipla, obteve-se a Equação 4.2 completa com todos os parâmetros significativos com  $p < 0,05$ .

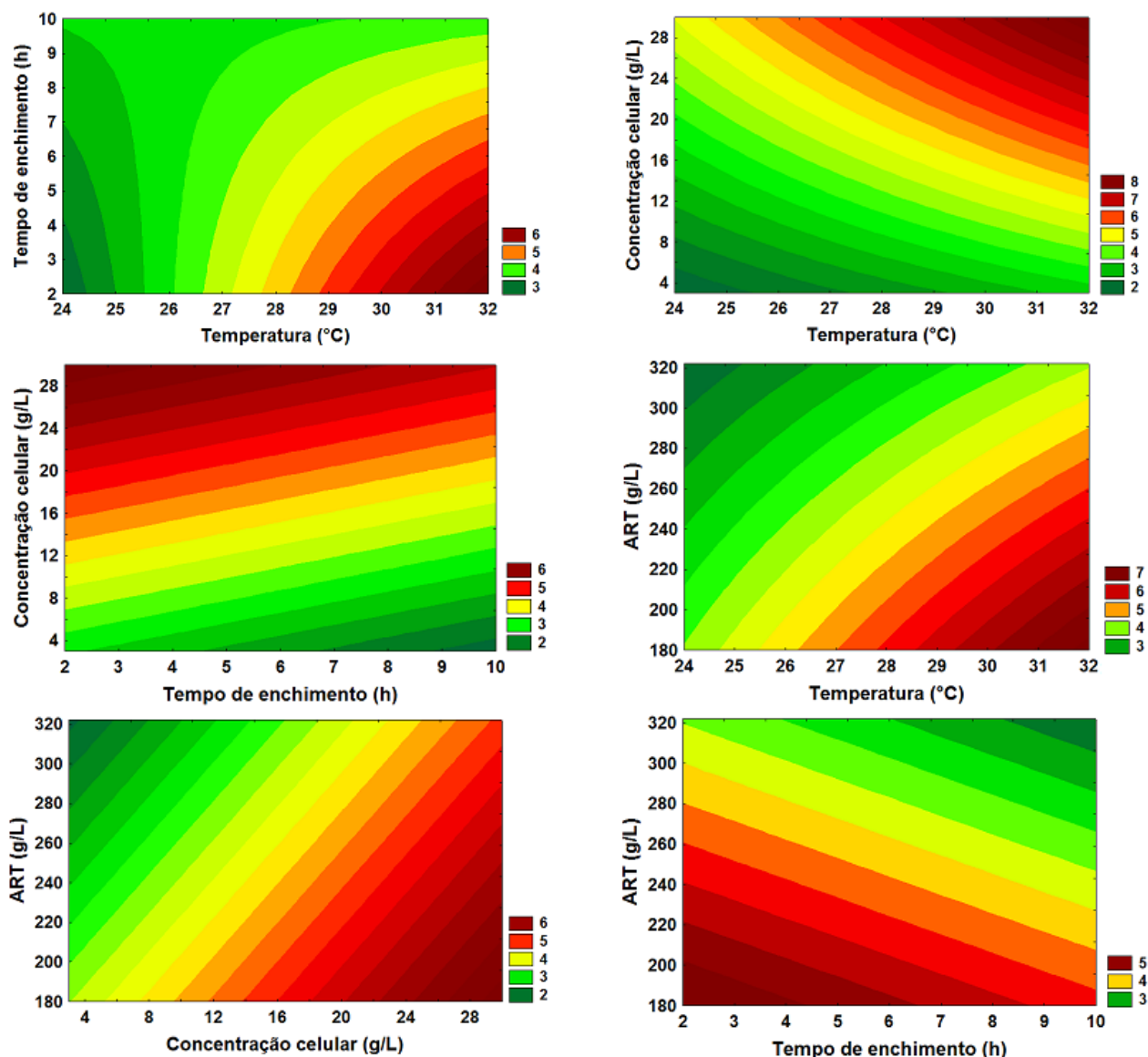
$$Pr_{etanol} (g_{etanol}/L.h) = 4,196 + 0,998 X_1 + 1,580 X_2 - 0,905 X_3 - 0,466 X_4 + 0,466 X_1X_2 - 0,291 X_1X_3 - 0,832 X_1X_4 \quad (4.2)$$

Pode-se observar pela Tabela 4.3, que as variáveis isoladas  $X_1$  e  $X_2$  exerceram maiores efeitos sobre a produtividade. Por outro lado, o efeito das variáveis  $X_3$  e  $X_4$ , com sinais negativos, mostram que para maiores concentração de açúcares redutores na alimentação e maiores tempos de enchimento há menores valores de produtividade no tempo de 24 horas avaliado. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi de 0,999, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da produtividade, mostrando que 99,9% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

Para a resposta produtividade em etanol houve uma variação de 1,84 g<sub>etanol</sub>/L.h (Experimento 3) a 9,73 g<sub>etanol</sub>/L.h (Experimento 6). Observa-se que no Experimento 6, com nível inferior de tempo de enchimento e concentração de ART, favorecem no aumento da produtividade, já o Experimento 3 em que o tempo de enchimento e a concentração de ART estão no nível superior, a produtividade é baixa.

Guidini et al. (2013), utilizando a cepa C2/00 de *Saccharomyces cerevisiae* obteve produtividade igual a 6,47 g<sub>etanol</sub>/L.h em 10,5 horas de fermentação a 32°C.

A partir do modelo, foram construídas as curvas de contorno e assim definido a região de trabalho de maior interesse para o processo conforme Figura 4.8.



**Figura 4.8** - Curvas de contorno para a resposta produtividade avaliando as variáveis temperatura, concentração celular no inóculo, concentração ART na alimentação e tempo de enchimento do reator duas a duas.

Na Figura 4.8 verifica-se que as produtividades maiores foram para as maiores concentrações de células no inóculo ( $X_2$ ), e menores concentrações de ART na alimentação. Para todas as variáveis estudadas, nos menores tempos de enchimento obtiveram-se as melhores produtividades, pois quanto maior o tempo de enchimento, maior será o tempo para o término do processo fermentativo. A temperatura que favoreceu uma melhor produtividade ficou na faixa de 26 a 32°C. Ferreira (2005) verificou que as maiores produtividades também ocorreram para as maiores concentrações de inóculo, 40%, e menores tempos de enchimento, 3 horas.



### 4.3.3 Açúcar residual

Outra resposta analisada foi o açúcar residual, ou seja, a concentração de açúcares residuais presentes no meio após 24h de fermentação. Ao contrário das respostas rendimento e produtividade, é interessante que o açúcar residual seja minimizado, afinal não se deseja que cessado o processo ainda haja matéria-prima a ser consumida, pois tal fato resultaria em prejuízo para a indústria, e esse açúcar pode acabar sendo agregado ao efluente do processo, provocando problemas ambientais e no processo de destilação. Na Tabela 4.4, estão apresentados os coeficientes de regressão das variáveis e interações, incluindo os parâmetros significativos para a resposta concentração de açúcar residual, com todos os parâmetros significativos com  $p < 0,10$ .

**Tabela 4.4** - Resultados da regressão múltipla para a resposta açúcar residual, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Efeito	Nível de significância p-valor
Média	75,322	75,322	0,000000
$X_1$	-26,212	- 52,424	0,000006
$X_2$	-26,142	- 52,284	0,000006
$X_3$	64,642	129,284	0,000000
$X_4$	-7,928	- 15,856	0,000218
$X_1X_3$	-17,892	- 35,784	0,000019
$X_1X_4$	-15,462	- 30,924	0,000030
$R^2 = 0,99$			

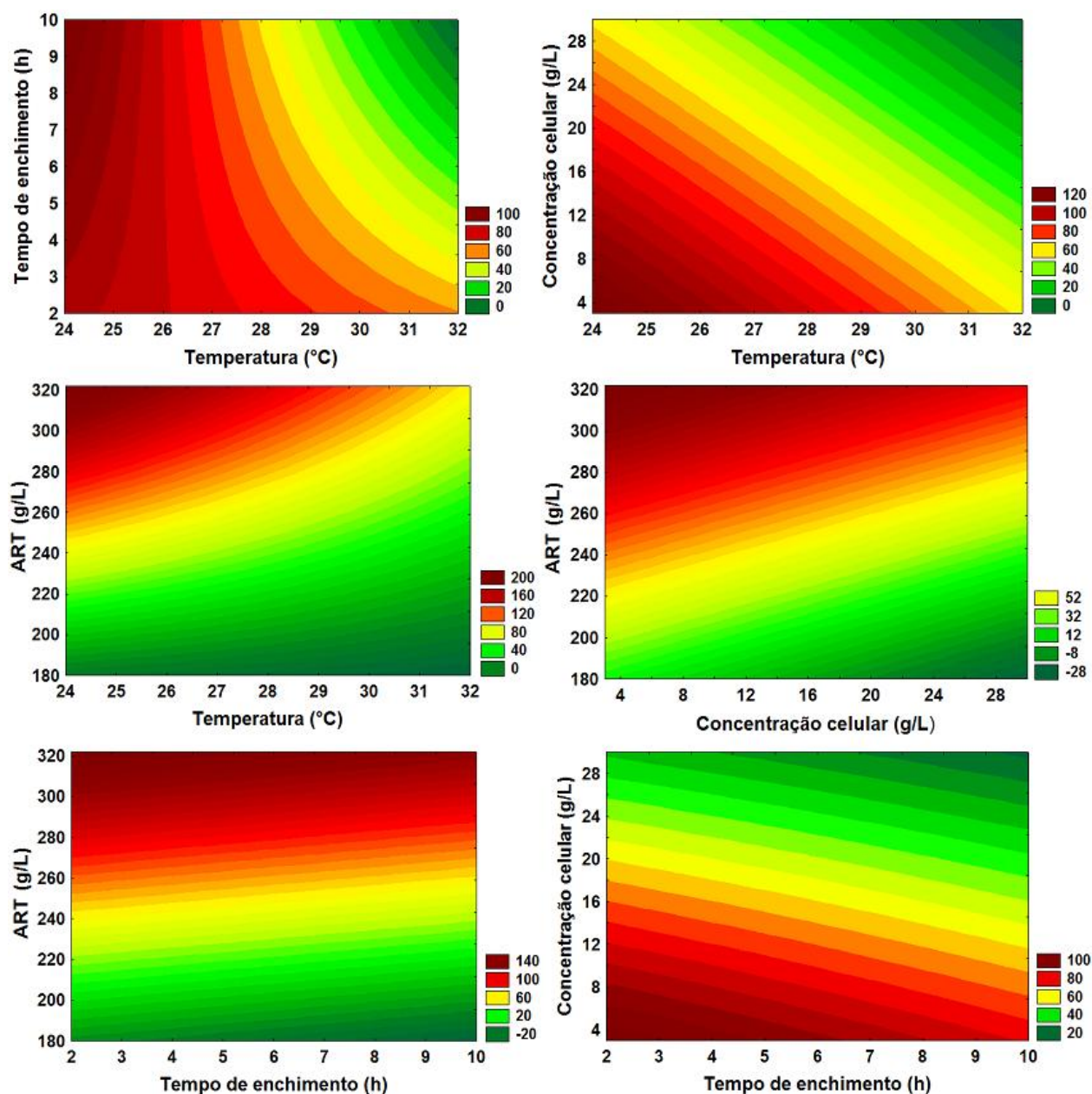
O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 4.3.

$$ART_{Residual} (g/L) = 75,322 - 26,212 X_1 - 26,142 X_2 + 64,642 X_3 - 7,928 X_4 - 17,892 X_1X_3 - 15,462 X_1X_4 \quad (4.3)$$

A partir da Tabela 443 percebe-se que os efeitos das variáveis isoladas  $X_1$  e  $X_2$  exerceram influência na diminuição da resposta, mostrando que se deve utilizar temperatura maior e maior concentração celular para a diminuição da concentração de sacarose residual. O efeito da variável isolada  $X_3$  exerceu maior influência na resposta sacarose residual como era

esperado, pois para maiores concentrações de açúcares redutores na alimentação têm maiores concentrações de sacarose residuais.

Analisando as curvas de contorno apresentadas na Figura 4.9 definiram-se as faixas de concentração celular no reator, de temperatura, de ART na alimentação e de tempo de enchimento que minimizam a resposta açúcar residual.



**Figura 4.9** - Curvas de contorno para a resposta açúcar residual avaliando as variáveis temperatura, concentração celular no inóculo, concentração ART na alimentação e tempo de enchimento do reator duas a duas.

A curva que representa o efeito da concentração celular no inóculo em combinação com a tempo de enchimento do reator indica que para a minimização da resposta em questão, deve-se utilizar uma concentração celular no inoculo maior que 20 g/L. O efeito da concentração celular em sinergismo com a temperatura indica que a faixa de concentração celular deve ser maior que 16 g/L. O efeito da concentração celular em sinergismo com a concentração de ART, abrange toda a faixa de concentração celular estudada 3- 30 g/L. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para minimização do açúcar residual, na região experimental adotada, a concentração de células no inoculo deve ser superior a 20 g/L.

Da mesma forma que para a concentração de leveduras, a partir das curvas de contorno, definiu-se a faixa de concentração inicial de sacarose que minimiza o açúcar residual na região experimental trabalhada, a faixa aproximada de concentração de ART correspondente a quantidade mínima de açúcar residual esta entre 180 - 240 g/L. Para a temperatura e tempo de enchimento que minimiza o açúcar residual foram realizadas as mesmas análises das curvas de contorno na Figura 4.9 e obtiveram-se faixas de 27 a 32°C para a temperatura e tempos maiores ou iguais que 5 horas, respectivamente para a minimização da resposta estudada.

#### **4.3.4 Avaliação do planejamento fatorial fracionado para as respostas estudadas**

Baseado nos resultados do planejamento fatorial fracionado pode-se concluir que as variáveis que mais afetaram o processo de fermentação em batelada alimentada foram temperatura, concentração inicial de ART e concentração celular no inóculo. O tempo de enchimento do reator para maximizar as respostas rendimento e produtividade e minimizar o açúcar residual foi de 5 horas, que corresponde a um valor amplamente usado industrialmente. A faixa de concentração de ART que maximiza as respostas rendimento e produtividade, e minimiza o açúcar residual esta entre 200 e 260 g/L, a faixa de concentração celular no inóculo entre 15 e 30 g/L e a faixa de temperatura entre 26 e 32°C.

Assim a próxima etapa do trabalho consistiu da análise da influência das variáveis temperatura (26 – 32°C), concentração inicial de ART (200 – 260 g/L), concentração celular no inóculo (15 – 30 g/L) através de um planejamento composto central, em processo batelada alimentada com tempo de enchimento de 5 horas.

#### 4.4 Planejamento Composto Central

Neste planejamento composto central estudou-se como o rendimento  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{sacarose}}$ , a produtividade de etanol e a quantidade de açúcares residuais são afetados pela temperatura, concentração celular no inóculo e concentração inicial de substrato. Estas três variáveis independentes que afetam fortemente o desempenho da fermentação alcoólica foram avaliadas nas faixas: temperatura –  $X_1$  (24 a 34°C), concentração celular no inóculo –  $X_2$  (10 a 35 g/L), e concentração inicial de ART -  $X_3$  (180 a 280 g/L), todas estas variáveis foram analisadas durante 10 horas de processo fermentativo. Estas faixas de trabalho foram definidas a partir da análise dos resultados do planejamento fatorial fracionado.

A Tabela 4.5 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e as respostas concentração de açúcar residual, rendimento percentual  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{sacarose}}$  e produtividade de etanol. Observa-se na Tabela 4.5 que o rendimento variou de 37,63% (experimento 2) a 93,16% (experimento 13) e a produtividade de etanol esteve entre 5,01  $g_{\text{etanol}}/L.h$  (experimento 2) e 10,09  $g_{\text{etanol}}/L.h$  (experimento 10). Já a quantidade de açúcar residual variou de zero, no experimento 13, em que o substrato foi totalmente consumido no tempo igual às 10 horas propostas, a 155,1 g/L (experimento 2). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetitividade do processo.

Pode-se observar que a maior produtividade de etanol não ocorreu para a maior concentração de substrato presente no meio e sim na maior temperatura (34°C) e o maior rendimento foi observado no menor valor de concentração de açúcares redutores totais na alimentação. Sabe-se que o raciocínio cartesiano linear não deve ser aplicado para processos fermentativos complexos, pois uma série de fatores interligados determinam o comportamento do sistema. Este fato justifica a análise conjunta das variáveis propostas.

**Tabela 4.5** - Variáveis utilizadas no PCC e suas respostas em 10 horas de fermentação

Experimento	Valor real (Valor codificado)			Açúcar Residual (g/L)	Rendimento (%)	Produtividade (g <sub>etanol</sub> /L.h)
	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub> (g/L)			
1	26 (-1)	15 (-1)	200 (-1)	109,82	53,00	5,42
2	26 (-1)	15 (-1)	260 (+1)	155,10	37,63	5,01
3	26 (-1)	30 (+1)	200 (-1)	30,08	79,29	8,10
4	26 (-1)	30 (+1)	260 (+1)	82,02	65,49	8,70
5	32 (+1)	15 (-1)	200 (-1)	20,99	83,66	8,55
6	32 (+1)	15 (-1)	260 (+1)	90,80	66,24	8,80
7	32 (+1)	30 (+1)	200 (-1)	11,52	90,62	9,26
8	32 (+1)	30 (+1)	260 (+1)	65,01	70,01	9,30
9	24 (- $\alpha$ )	22,5 (0)	230 (0)	117,10	55,03	6,47
10	34 (+ $\alpha$ )	22,5 (0)	230 (0)	35,62	85,87	10,09
11	29 (0)	10 (- $\alpha$ )	230 (0)	80,00	67,28	7,91
12	29 (0)	35 (+ $\alpha$ )	230 (0)	22,82	82,75	9,73
13	29 (0)	22,5 (0)	180 (- $\alpha$ )	0	93,16	8,55
14	29 (0)	22,5 (0)	280 (+ $\alpha$ )	135,01	52,29	7,50
15 (C)	29 (0)	22,5 (0)	230 (0)	45,00	80,00	9,40
16 (C)	29 (0)	22,5 (0)	230 (0)	48,00	79,13	9,30
17 (C)	29 (0)	22,5 (0)	230 (0)	47,00	81,00	9,50

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos, foi considerado um nível de significância de 90%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que  $p < 0,1$ .

Com os resultados apresentados na Tabela 4.5, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa *Statistica 7.0*.

#### 4.4.1 Rendimento

A Tabela 4.6 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10%, desvio e valor do teste de *t de student* associado a cada um para a resposta rendimento, após a eliminação de parâmetros não significativos para a resposta rendimento.

**Tabela 4.6** – Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta rendimento

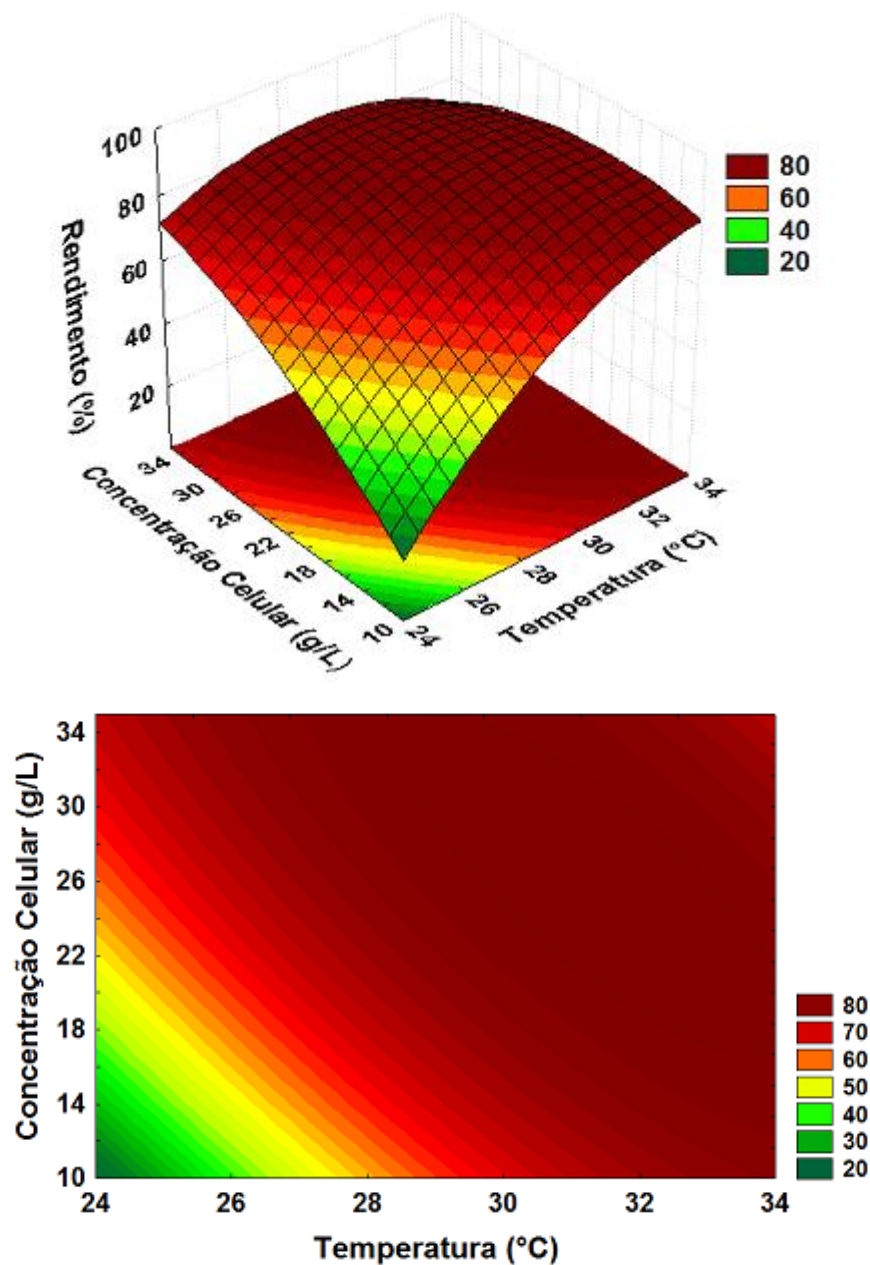
Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(10)	p
Média	80,32	2,37	33,89	0,000000
X <sub>1</sub> (L)	9,33	1,12	8,35	0,000016
X <sub>1</sub> (Q)	-4,37	1,24	-3,52	0,006560
X <sub>2</sub> (L)	6,66	1,11	5,98	0,000208
X <sub>2</sub> (Q)	-2,66	1,22	-2,18	0,057541
X <sub>3</sub> (L)	-9,95	1,11	-8,94	0,000009
X <sub>3</sub> (Q)	-3,47	1,22	-2,84	0,019482
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-5,43	1,45	-3,73	0,004698
R <sup>2</sup> =0,96				

Os parâmetros não significativos, que puderam ser desprezados para o nível de significância adotado, foram: interações entre as variáveis X<sub>1</sub>X<sub>3</sub> e X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>, em que a variável X<sub>3</sub> não exerceu influência significativa sobre o rendimento por interações com as outras variáveis. O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 4.4.

$$Y_{p/s}(\%) = 80,32 + 9,33X_1 - 4,37X_1^2 + 6,66X_2 - 2,66X_2^2 - 9,95X_3 - 3,47X_3^2 - 5,43X_1X_2 \quad (4.4)$$

O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtido após o ajuste foi de 0,96, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 96% da variabilidade dos dados.

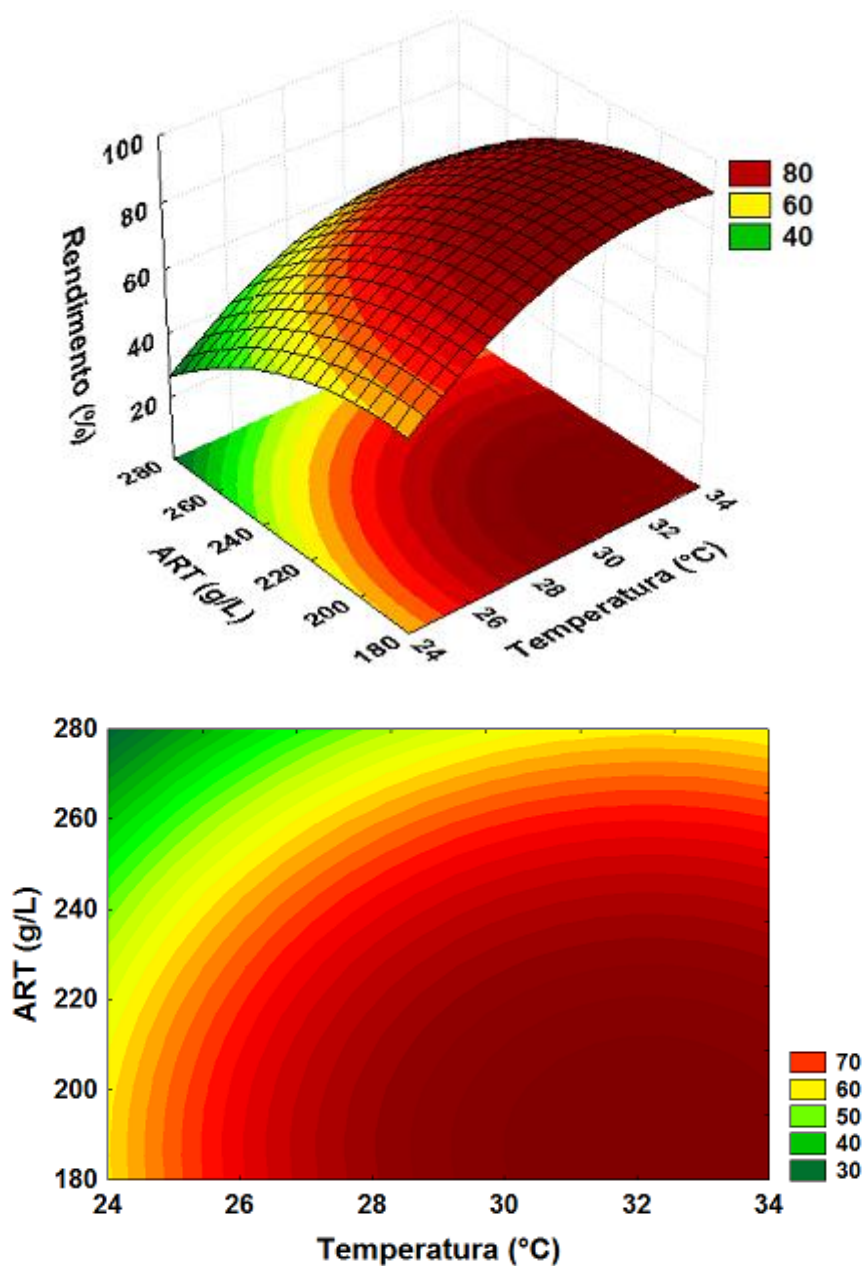
Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 4.10 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função da temperatura ( $X_1$ ) e concentração celular ( $X_2$ ) para o rendimento.



**Figura 4.10** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da temperatura.

Por se tratar de um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Sendo assim, a Figura 4.11 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função da temperatura ( $X_1$ ) e

ART ( $X_3$ ) e a Figura 4.12 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de Concentração celular ( $X_2$ ) e ART ( $X_3$ ).



**Figura 4.11** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART) e da temperatura.

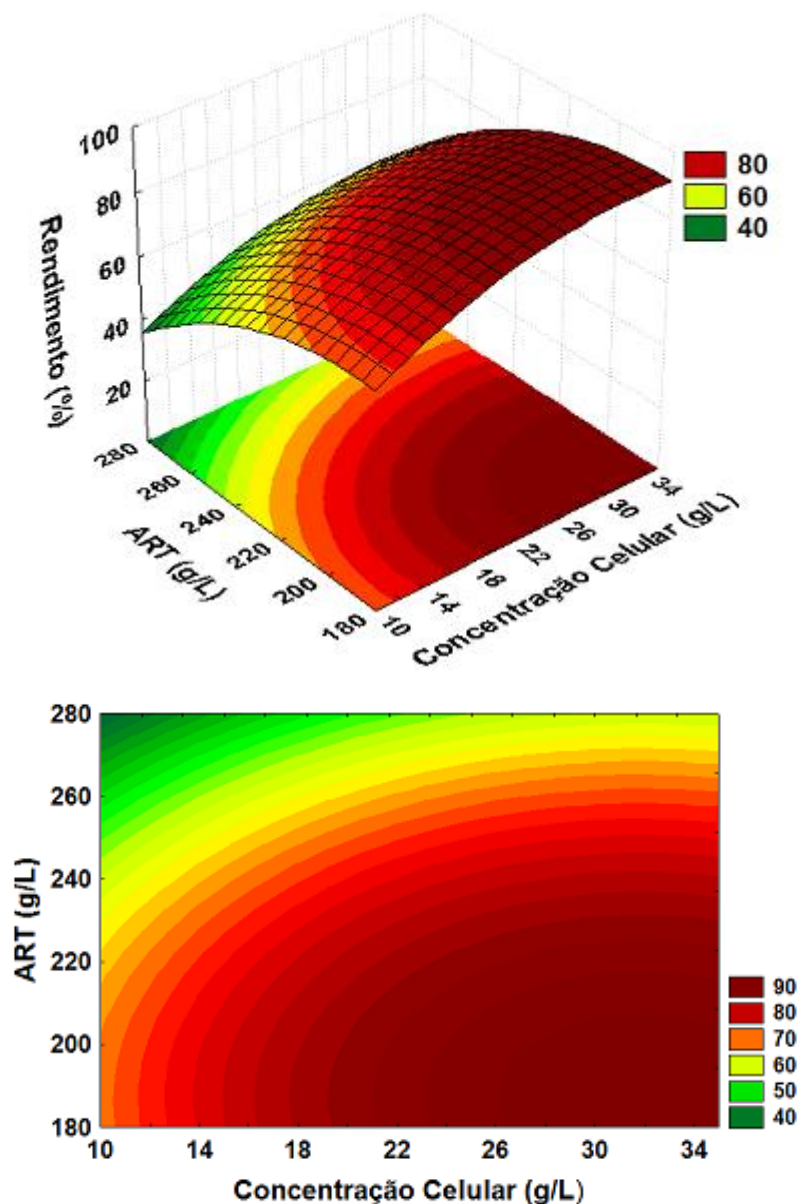
Analisando as curvas de contorno das Figuras 4.10 e 4.11 definiu-se a faixa de temperatura que maximiza o rendimento.

A curva de contorno que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração celular no inóculo (Figura 4.10) indica uma faixa aproximada de 27 a 34°C para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura com a



concentração inicial de ART na alimentação (Figura 4.11) indica também uma faixa de 27 a 34°C. Portanto, esta é a faixa que satisfaz ambos os efeitos combinados, ou seja, pode-se afirmar que para maximização do rendimento na produção de etanol, dentro da região experimental trabalhada, a temperatura deve estar entre 27 e 34°C.

Na Figura 4.12 observa-se que para obter-se rendimentos maiores que 90%, a concentração de açúcares redutores totais deve estar entre 180 a 220 g/L.



**Figura 4.12** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART).

Na Figura 4.11, observa-se também rendimentos maiores com concentração de açúcares redutores totais nesta mesma faixa. Vale ressaltar que o emprego de uma faixa maior

de concentração de sacarose é viável para o processo, pelo fato de poder utilizar caldos mais concentrados na indústria alcooleira.

Pacheco (2010) obteve uma faixa aproximada de sacarose inicial correspondente ao máximo rendimento entre 160 e 200 g/L, utilizando reator tubular tipo torre operando a 32°C.

Para a definição da concentração celular no inóculo que maximiza o rendimento na produção de etanol foi realizada a análise das curvas de contorno das Figuras 4.10 e 4.12. De acordo com esta análise é interessante que concentração celular no inóculo seja maior que 28 g/L.

Ferreira (2005) estudou como o rendimento  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{sacarose}}$  e a produtividade de etanol são afetados pela temperatura, concentração celular no inóculo e tempo de enchimento do reator. Estas três variáveis independentes foram avaliadas nas faixas: temperatura (27,3 a 40,7°C), concentração celular no inóculo (13,2 a 46,80%), e tempo de enchimento do reator (0 a 6 horas), todas estas variáveis foram analisadas durante 10 horas de processo fermentativo e com concentração de sacarose no meio de 180 g/L. A partir deste estudo Ferreira (2005) verificou que o rendimento em etanol variou significativamente com a temperatura, sendo que o rendimento em etanol obtido nos ensaios foi alto quando o valor da variável temperatura assumiu valores extremos (27,3°C e 38°C) e que o rendimento em etanol também obteve significância com a concentração de inóculo, quanto maior a concentração de inóculo maior foi o  $Y_{P/S}$ . Tais conclusões foram semelhantes as obtidas neste trabalho.

O experimento 13 do Planejamento composto central, realizado a 29°C com 5 horas de enchimento do reator, concentração celular de 22,5 g/L e de sacarose de 180 g/L, apresentou produtividade de 8,55  $g_{\text{etanol}}/L.h$  e rendimento de 94%. Ferreira (2005) em seus estudos utilizando a mesma concentração inicial de sacarose de 180 g/L, tempo de enchimento de 5 horas, temperatura de 30°C e 40% de concentração celular obteve respostas inferiores para a produtividade (7,42  $g_{\text{etanol}}/L.h$ ) e rendimento (88%). Ao realizar outro experimento com as mesmas condições diferindo apenas a concentração do inóculo para 20%, Ferreira (2005) obteve uma produtividade menor (6,23  $g_{\text{etanol}}/L.h$ ) e o rendimento se manteve o mesmo (88%).

#### 4.4.2 Produtividade

A Tabela 4.7 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, além dos níveis de significância, desvio e valor do teste de *t de student* associado a cada um.

As variáveis significativas do modelo para a resposta produtividade foram: temperatura no seu termo linear  $X_1$  (L), temperatura no seu tempo quadrático  $X_1$  (Q), concentração celular do inóculo em seu termo linear  $X_2$  (L) e quadrático  $X_2$  (Q), concentração de sacarose em seu termo quadrático  $X_3$  (Q) e as interações temperatura/concentração celular no inóculo -  $X_1X_2$ . Após a eliminação dos parâmetros não significativos, que foram  $X_3$  (L) e as interações  $X_1X_3$  e  $X_2X_3$  com  $p > 0,10$ , foram obtidos os seguintes parâmetros, conforme Tabela 4.6.

**Tabela 4.7** – Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta produtividade

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(10)	p
Média	9,43	0,25	37,08	0,000000
$X_1$ (L)	1,09	0,12	9,06	0,000004
$X_1$ (Q)	-0,50	0,13	-3,74	0,003885
$X_2$ (L)	0,78	0,12	6,53	0,000066
$X_2$ (Q)	-0,30	0,13	-2,26	0,047134
$X_3$ (Q)	-0,58	0,13	-4,40	0,001337
$X_1.X_2$	-0,65	0,156	-4,13	0,002034
$R^2=0,94$				

A Equação do modelo, desconsiderando os parâmetros não significativos é dada pela Equação 4.5.

$$Pr_{etanol}(g_{etanol}/L.h) = 9,43 + 1,09 X_1 - 0,50 X_1^2 + 0,78 X_2 - 0,30 X_2^2 - 0,58 X_3^2 - 0,65 X_1X_2 \quad (4.5)$$

Pode-se notar pela Equação 4.5, que as variáveis isoladas  $X_1$  e  $X_2$  exerceram maiores efeitos sobre a produtividade, sendo que, com maiores temperaturas e concentrações de células no inóculo para produção de etanol a taxa inicial de fermentação é maior, logo a produtividade é maior, como mostrado na Equação 4.5.

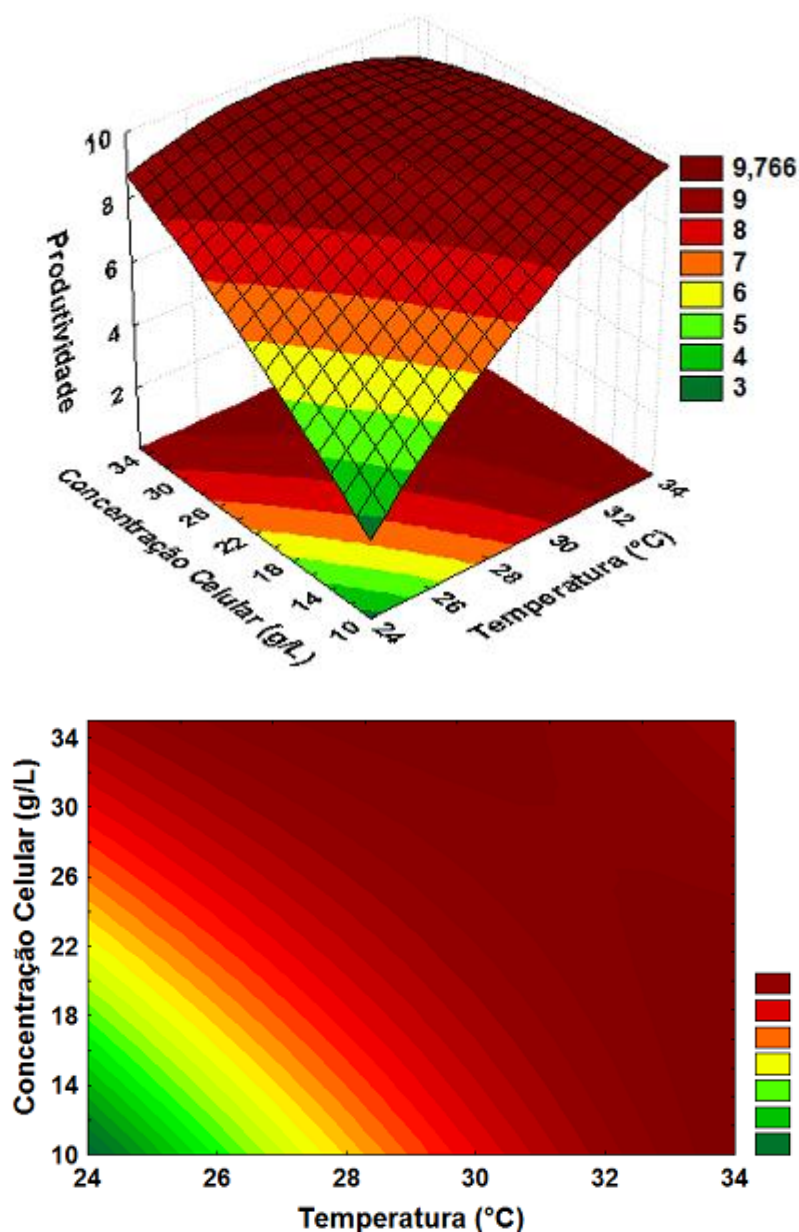
O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,94, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da produtividade, mostrando que 94% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

Para a resposta produtividade em etanol houve uma variação de 5,01 g<sub>etanol</sub>/L.h (Experimento 2) a 10,09 g<sub>etanol</sub>/L.h (Experimento 10). A partir do modelo, foram construídas as superfícies de respostas e assim definido a região de trabalho de maior interesse para o processo. A Figura 4.13 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função da temperatura e da concentração de células no inóculo. Nota-se que para uma maior produtividade, se faz necessário maiores concentrações de células no inóculo e temperaturas mais altas (29°C) o qual fica claro a influência da variável  $X_1$  e  $X_2$ , como evidenciado na Equação 4.5.

Segundo Wheals (1999), a utilização de altas concentrações de células e altas temperaturas, até 35°C, contribuem para redução do crescimento celular e aumento da produção de álcool (8 a 11°GL), gerando uma alta produtividade. O experimento 10 do PCC o qual empregou a maior temperatura (34°C) foi o que obteve maior produtividade (10,09 g<sub>etanol</sub>/L.h) confirmando tal afirmação.

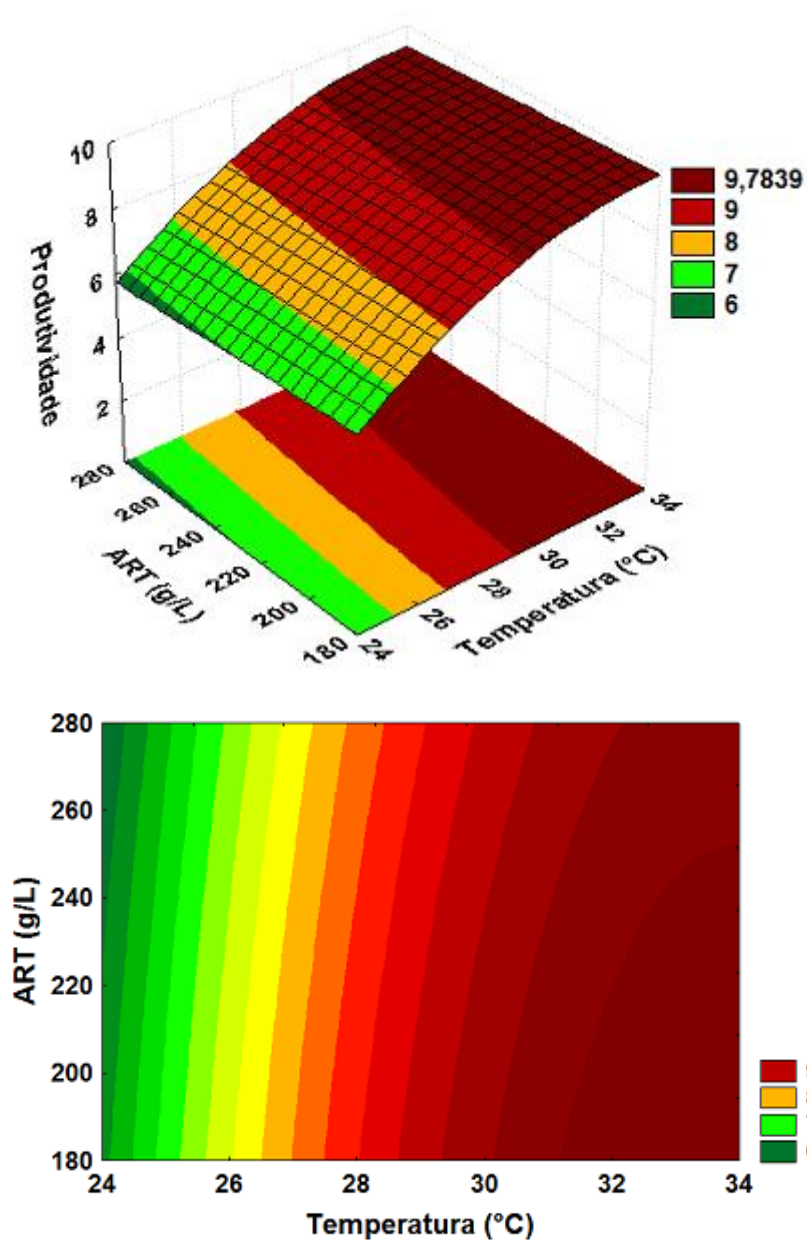
Ferreira (2005) obteve a maior produtividade, 9,6 g<sub>etanol</sub>/L.h, utilizando em uma das suas fermentações temperatura de 34°C, com 180 g/L de sacarose, 30% concentração celular e 3 horas de enchimento do reator.

Pacheco (2010) obteve produtividade de 13,3g<sub>etanol</sub>/L.h operando em um reator tipo torre a 32°C com concentração celular no inóculo de 40% e concentração inicial de sacarose de 204 g/L.

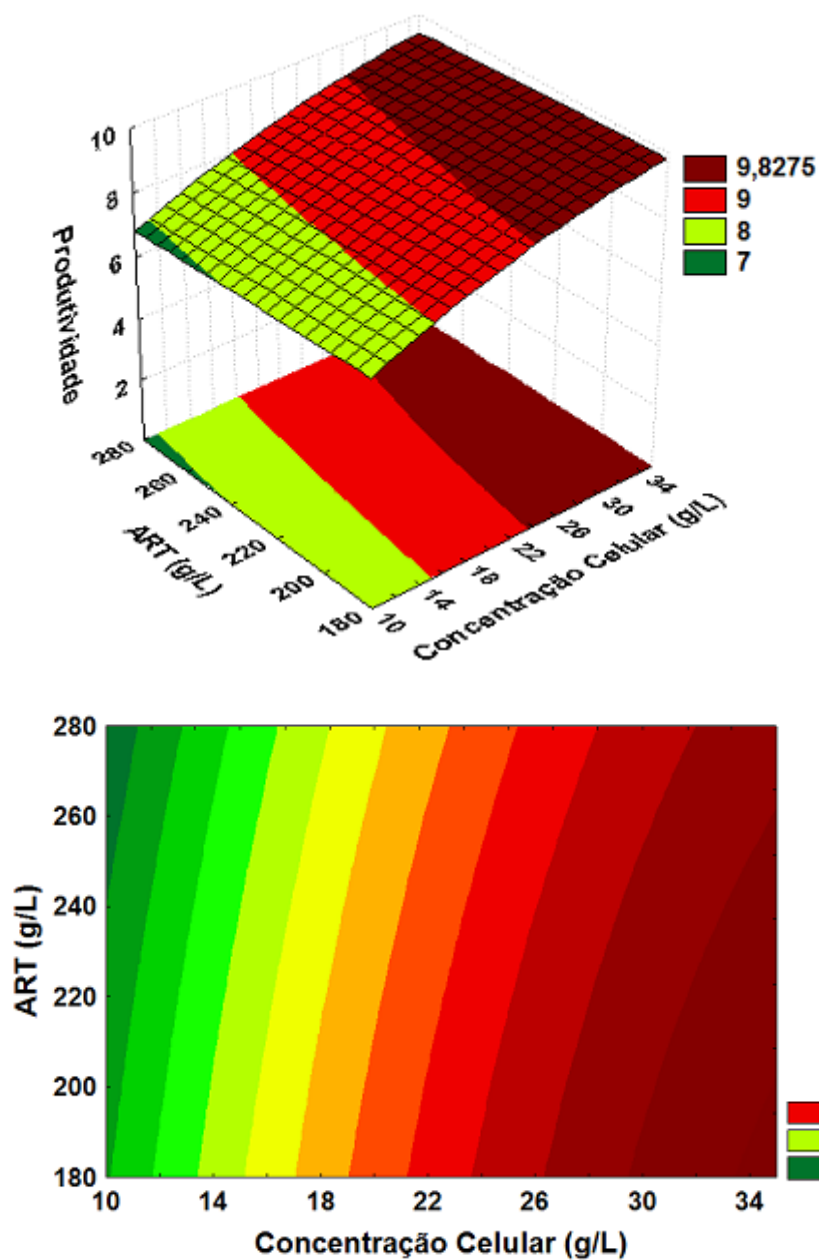


**Figura 4.13** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração celular no inóculo e da temperatura.

As Figuras 4.14 e 4.15 ilustram a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  (temperatura) versus  $X_3$  (concentração de sacarose) e  $X_2$  (concentração celular) versus  $X_3$  (concentração de sacarose) respectivamente para a produtividade. Nestas figuras percebe-se que a faixa de concentração de substrato estudada (180-280 g/L) aumenta a produtividade para temperaturas maiores que 29°C e concentrações celulares maiores que 24 g/L.



**Figura 4.14** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART) e da temperatura.



**Figura 4.15** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta produtividade em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART).

### 4.4.3 Açúcar residual

Outra resposta analisada foi o açúcar residual, ou seja, a concentração de açúcar residual presente no meio após 10 horas de fermentação. A minimização desta variável é interessante para se evitar prejuízos e problemas ambientais anteriormente citados no item 4.3.3. Na Tabela 4.8, estão apresentados os coeficientes de regressão das variáveis e interações dos parâmetros significativos para a resposta açúcar residual. Nesta tabela podem ser vistos, também, os valores dos níveis de significância relacionados aos parâmetros, o desvio padrão com relação a cada um, e o valor do teste de *t de student* associado.

**Tabela 4.8** - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a resposta açúcar residual.

Variáveis e interações	Coeficiente de Regressão	Desvio	t(10)	P
Média	49,715	4,267	11,65136	0,000000
X <sub>1</sub> (L)	-23,938	2,675	-8,95086	0,000004
X <sub>1</sub> (Q)	10,890	2,844	3,82976	0,003320
X <sub>2</sub> (L)	-20,811	2,664	-7,81141	0,000015
X <sub>3</sub> (L)	32,774	2,664	12,30030	0,000000
X <sub>3</sub> (Q)	7,546	2,800	2,69495	0,022507
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	14,694	3,481	4,22104	0,001769
R <sup>2</sup> =0,97				

A equação do modelo, considerando apenas os parâmetros significativos é dada pela Equação 4.6.

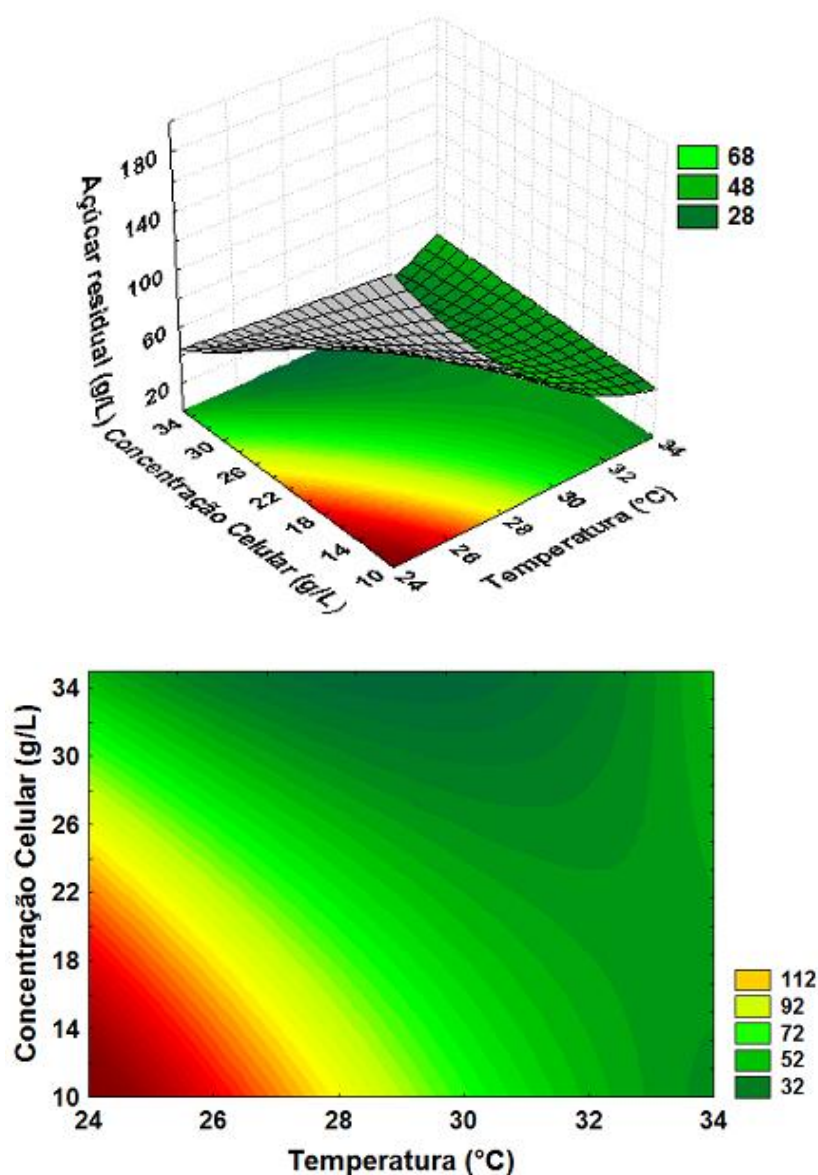
$$\begin{aligned}
 ART\ Residual\ (g/L) = & 49,715 - 23,938 X_1 + 10,890 X_1^2 - 20,811 X_2 + 32,774 X_3 + 7,546 X_3^2 \\
 & + 14,694 X_1 X_2
 \end{aligned}
 \quad (4.6)$$

Observando a Equação 4.6, percebe-se que as variáveis isoladas X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> exerceram grande influência no aumento da resposta, mostrando que se deve utilizar temperatura maior e maior concentração celular para diminuir o efeito da sacarose residual. A variável isolada X<sub>3</sub> mostra que a utilização de uma menor concentração de açúcar minimiza o seu resíduo. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtido após o ajuste foi de 0,97, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção do açúcar residual, mostrando que 97% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta.



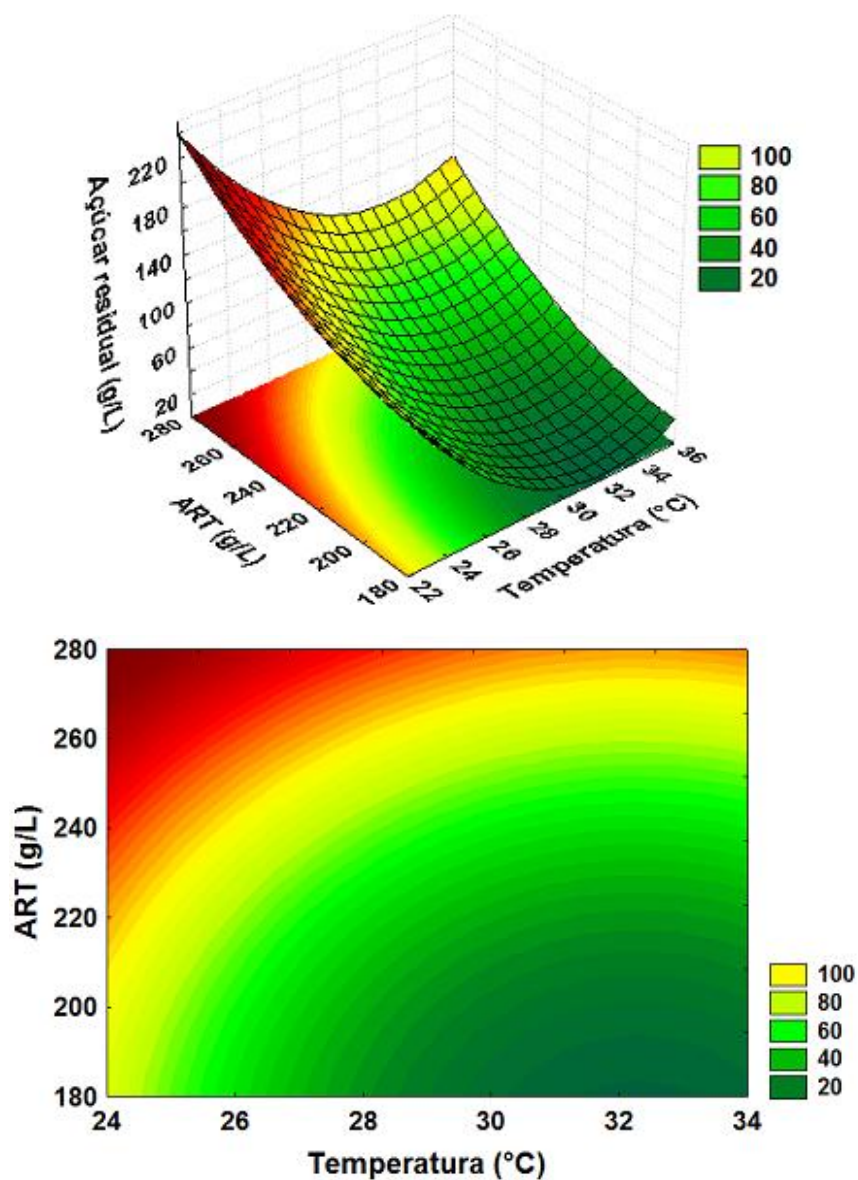
O açúcar residual variou de 0 g/L (Experimento 13) a 135,01 g/L (Experimento 14). Estes experimentos foram realizados nas mesmas condições de temperatura e concentração celular, que foram 29°C e 22,5 g/L respectivamente. A concentração de açúcar residual na alimentação variou de 180 ( $-\alpha$ ) a 280 ( $+\alpha$ ) g/L. Se essa variável assume valores codificados superiores ao nível central (0,0), tem-se uma alta concentração de açúcar residual. Para valores codificados inferiores ao nível central têm-se uma redução da quantidade de sacarose residual. Tal observação é perfeitamente condizente com o comportamento esperado. É natural que, para um tempo fixo de fermentação, quanto mais açúcar estiver presente no meio no início da fermentação, para uma concentração fixa de leveduras e temperatura, maior será seu nível residual cessado no tempo proposto.

A partir do modelo, foram construídas as superfícies de respostas e assim definido a região de menor concentração de açúcar residual ao final do processo. A Figura 4.16 ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno em função de  $X_1$  (temperatura) e  $X_2$  (concentração celular no inóculo) para a sacarose residual. Nota-se que a resposta concentração de açúcar residual é menor para concentrações celular no inóculo maiores que 30 g/L e temperaturas tendendo para o máximo estudado.

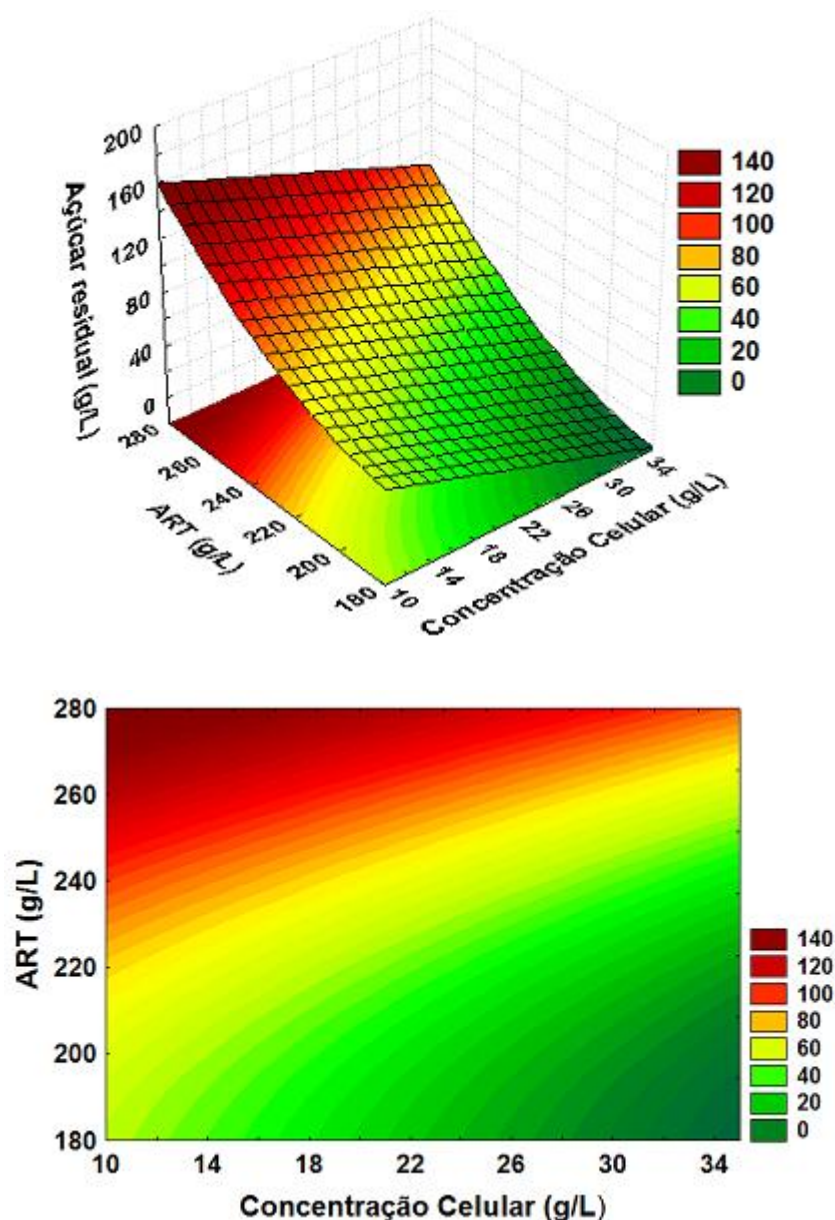


**Figura 4.16** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular no inóculo e da temperatura.

A partir das curvas de contorno das Figuras 4.17 e 4.18, e seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, definiu-se a faixa de concentração inicial de sacarose que minimiza a concentração final de ART residual na região experimental trabalhada. O efeito combinado da temperatura e da concentração de açúcar inicial indica que a faixa de concentração de ART no início do processo fermentativo deve ser igual a 180 - 240 g/L e a temperatura esta entre 26- 32°C, para que a concentração residual de sacarose seja mínima.



**Figura 4.17** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART) e da temperatura.



**Figura 4.18** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular no inóculo e da concentração inicial de sacarose na alimentação (ART).

Da mesma forma que para a concentração inicial de sacarose e temperatura, a partir da Figura 4.18, definiu-se a faixa de concentração celular que minimiza a concentração residual de sacarose no meio, decorrido o tempo total definido para a fermentação. De acordo com esta análise, seguindo o mesmo procedimento dos casos anteriores, conclui-se que a concentração celular deve estar entre 18 e 35 g/L e a concentração inicial de ART novamente deve estar entre 180 a 240 g/L.

#### 4.1 Experimentos de validação

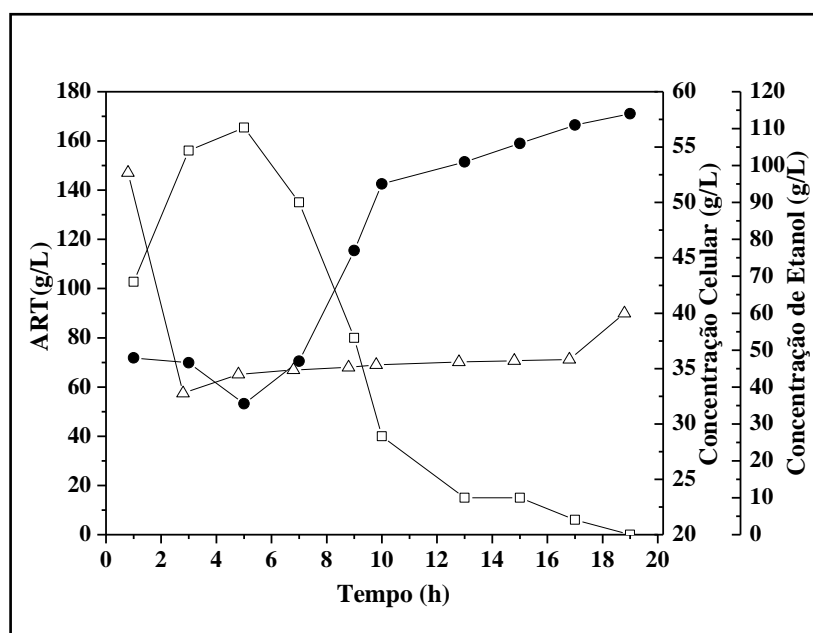
O principal objetivo desta etapa foi verificar se empregadas as condições experimentais indicadas pela análise das superfícies de resposta do planejamento composto central, as respostas obtidas seriam satisfatórias.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, concluiu-se que para maximizarmos as respostas estudadas rendimento e produtividade e minimizarmos a concentração de açúcar residual, a concentração celular no inóculo deve ser alta para atender a todas as respostas, sendo assim maior que 30 g/L. Como a concentração celular não é um entrave econômico para uma fermentação alcoólica, optou-se por trabalhar com altos níveis celulares no inóculo na tentativa de otimizar as respostas. A concentração de sacarose na alimentação que otimiza a resposta rendimento deve estar entre 180 e 240 g/L, mesma faixa que garante uma produtividade máxima. A mesma análise foi feita para a temperatura e obteve-se uma faixa de 26 a 29°C.

Optou-se por avaliar duas situações distintas consideradas serem as melhores para a fermentação alcoólica em questão: realizar uma fermentação utilizando as mesmas condições de adaptação da levedura do planejamento composto central e realizar uma segunda fermentação utilizando a levedura adaptada por dez vezes como descrito no item 3.5 desta dissertação.

Portanto, as condições para realização dos experimentos para validação foram definidas baseando-se nas faixas de interesse para as respostas avaliadas na literatura, e considerando-se os critérios técnicos e econômicos. Pela análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno, definiu-se como condição a ser reproduzida experimentalmente: concentração celular no inóculo, 35 g/L, concentração inicial de ART de 240 g/L e temperatura de 26°C.

Na Figura 4.19 pode-se observar os perfis de consumo de sacarose e de produção de etanol em função do tempo, bem como o crescimento celular em função do tempo para a condição máxima obtida pela análise das superfícies de resposta (35g/L de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 240 g/L e temperatura de 26°C). Obteve-se no tempo final de fermentação de 19 horas um rendimento de 93,0%, produtividade de 6,0 g<sub>etanol</sub>/L.h, teor alcoólico de 14,4°GL, com o consumo total de todo o substrato.



**Figura 4.19** - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART (□), concentração de etanol (●) e concentração celular (Δ) em função do tempo, para o experimento realizado a 26°C.

Para avaliar os possíveis resultados das respostas estudadas no tempo de 10 horas, mesmo tempo estudado no PCC, fez-se necessário a obtenção das equações em termos das variáveis não codificadas, substituindo as equações 3.9, 3.10 e 3.11 nas equações 4.4 4.5 e 4.6, assim foi possível encontrar as equações que representam as respostas rendimento, produtividade e açúcar residual nos seus valores normais, Equações 4.7, 4.8, e 4.9 respectivamente.

$$Y_{P/S} (\%) = -747,3 + 36,7T - 0,485T^2 + 10,015X_0 - 0,047X_0^2 + 1,44S_0 - 0,0038S_0^2 - 0,24X_0T \quad (4.7)$$

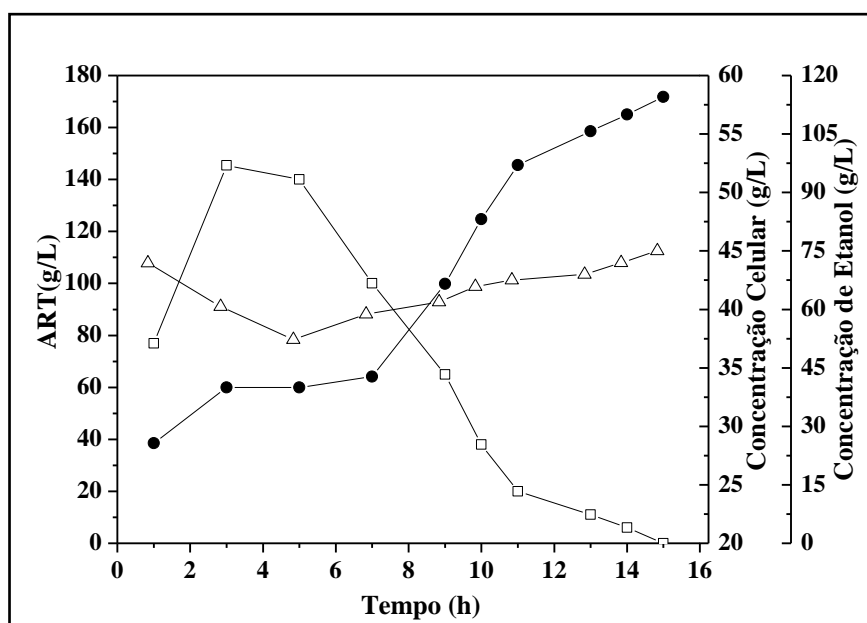
$$Pr_{etanol}(g_{etanol}/L.h) = -105,81 + 4,24 T - 0,056 T^2 + 1,18X_0 - 0,005 X_0^2 + 0,3 S_0 - 6,44 \cdot 10^{-4} S_0^2 - 0,03 X_0T \quad (4.8)$$

$$ART_{residual} (g/L) = 1979,554 - 92,853 T + 1,21 T^2 - 21,714 X_0 - 2,7644 S_0 + 0,00838 S_0^2 + 0,653 X_0 T \quad (4.9)$$

De acordo com os resultados apresentados no experimento de validação (Figura 4.19) em 10 horas de fermentação obteve-se rendimento de 77,50%, produtividade de 9,50

$\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$  e 40,10 g/L de ART residual. Pelas equações de 4.9 a 4.11 obteve-se rendimento de 76,98%, produtividade de 9,35  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$  e açúcar residual de 37,96 g/L. Estes resultados mostram que as equações de otimização fornecidas pelo planejamento composto central conseguiram descrever bem o comportamento do processo de fermentação, validando assim o modelo.

Foi realizada uma segunda fermentação utilizando a levedura adaptada por dez vezes. A Figura 4.20 apresenta os perfis de consumo de ART e de produção de etanol em função do tempo, bem como o crescimento celular em função do tempo, para a condição escolhida dentro da faixa ótima, através da análise das superfícies de resposta (35 g/L de células no inóculo, concentração inicial de sacarose de 240 g/L e temperatura de 26°C). Nesta fermentação avaliou-se também a influência da adaptação da levedura utilizando as condições que maximizam as respostas estudadas.



**Figura 4.20** - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado a 26 °C, com adaptação da levedura.

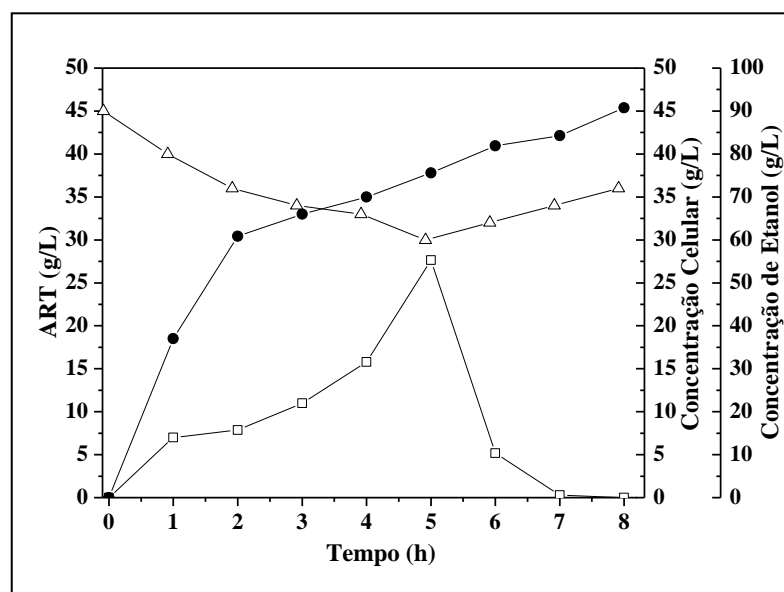
Obteve-se no tempo final da fermentação de 15 horas um rendimento de 93,6%, produtividade de 7,8  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$ , teor alcoólico de 14,7°GL, consumindo todo o substrato. Fazendo a mesma avaliação no tempo de 10 horas, mesmo tempo estudado no PCC, obtêm-se rendimento de 79,1%, produtividade de 9,7  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$  e 38,0 g/L de ART residual.

Fazendo uma comparação entre este experimento com a levedura adaptada e o anterior foi possível observar uma diminuição no tempo de fermentação de 4 horas, o que nos mostra a vantagem de se trabalhar com a levedura adaptada.

## 4.2 Fermentações com caldo de cana-de-açúcar

Nestes experimentos a levedura empregada foi adaptada a 4°C em 10 etapas sucessivas, conforme item 3.5. Foram realizadas inicialmente duas fermentações com caldo de cana-de-açúcar, utilizando concentração celular de 30 g/L e acertando o pH do inóculo para 2,5 nas temperaturas de 24 e 32°C. O valor de pH 2,5 é utilizado industrialmente no inóculo da fermentação alcoólica.

A Figura 4.21 mostra os perfis de concentração de ART, etanol e concentração celular na primeira fermentação conduzida a 32°C, em batelada alimentada com 5 horas de alimentação de meio na concentração de 189,5 g/L de ART e inóculo de 30 g/L com adaptação da levedura por dez vezes na temperatura de 4°C. Após 8 horas de fermentação, o teor alcoólico atingiu 11,5°GL. A concentração celular que no início desta primeira fermentação era de 45 g/L, até 5 horas de fermentação sofreu o efeito da diluição devido alimentação do meio atingindo 30,8 g/L e no final da fermentação alcançou 36 g/L com uma viabilidade de 92,7%. Este resultado demonstra que mesmo após o término da alimentação a levedura continuou crescendo, mesmo com elevado teor alcoólico.

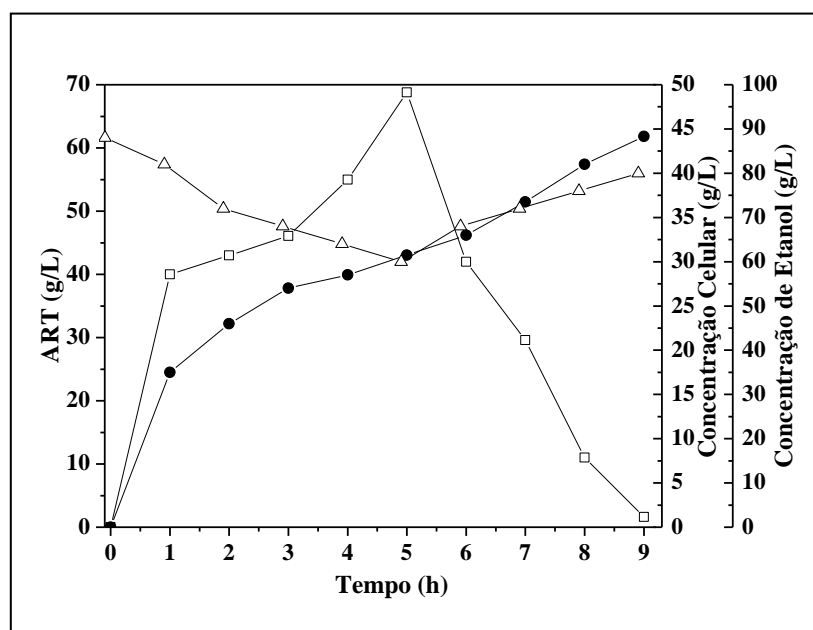


**Figura 4.21** - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado com caldo de cana-de-açúcar a 32°C.



A Figura 4.22 apresenta os perfis de concentração de sacarose, etanol e concentração celular da segunda fermentação conduzida a 24°C. Nesta fermentação utilizou-se as mesmas condições da primeira a 32°C. Após 9 horas de fermentação, o teor alcoólico atingiu 12,1°GL, a concentração celular 40g/L e a viabilidade 93,7%. A adaptação da levedura a 4°C implicou em excelentes resultados para fermentação conduzida a 24°C, se comparado com os resultados preliminares deste trabalho. O tempo de fermentação reduziu drasticamente, apresentou um rendimento de 94%, alta viabilidade celular e produtividade em etanol de 10,1 g/L.h. Além do mais, houve crescimento celular sensível após o término da alimentação do substrato.

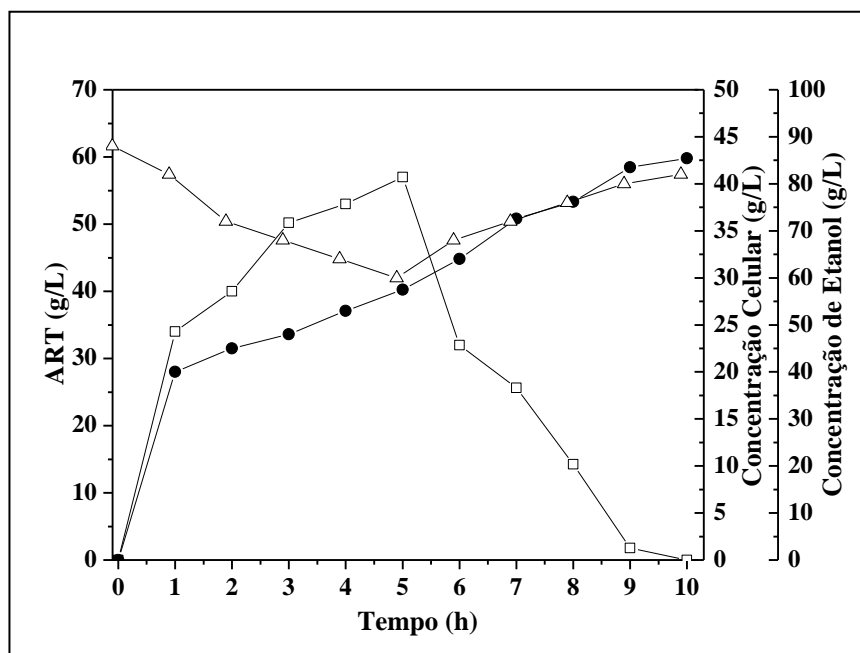
Romaní et al. (2015) concluíram que a caracterização continuada de tipos selvagem ou estirpes adaptadas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser importante para o futuro no desenvolvimento de processos com base em leveduras eficientes.



**Figura 4.22** - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado com caldo de cana-de-açúcar a 24°C.

Com o intuito de verificar qual variável, pH ou adaptação, teve maior influência na eficiência da fermentação, foi realizada uma terceira fermentação, a 24°C com caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura, sem acertar o pH do inóculo.

A Figura 4.23 apresenta os perfis de concentração de sacarose, etanol e concentração celular da terceira fermentação conduzida a 24°C.



**Figura 4.23** - Perfis de concentração de açúcar redutor total- ART ( $\square$ ), concentração de etanol ( $\bullet$ ) e concentração celular ( $\Delta$ ) em função do tempo, para o experimento realizado com caldo de cana-de-açúcar a 24°C, sem ajuste do pH no inóculo.

Observa-se que o tempo de fermentação foi de 10 horas, a concentração de álcool de 85,4 g/L gerando um teor alcoólico de 10,8°GL e viabilidade de 91,8%. Estes resultados foram inferiores a aqueles obtidos na fermentação realizada ajustando-se o pH do inóculo para 2,5. A concentração celular ao final da fermentação foi de 41 g/L, praticamente idêntica a segunda fermentação realizada a 24°C com ajuste de pH no inóculo. Este fato provavelmente justifica-se devido o baixo pH do inóculo contribuir para a inversão da sacarose, disponibilizando os açúcares na forma de hexoses, glicose e frutose, prontamente assimiláveis pela levedura. Nesta fermentação o rendimento alcançado foi 88,5%, a viabilidade celular foi ligeiramente menor e a produtividade foi 8,54 g/L.h.

Viegas (2003) obteve rendimento em torno de 87% em uma unidade de fermentação contínua convencional, ou seja, que utiliza separadoras centrífugas e células de leveduras não floculantes, em reatores de mistura, utilizando melaço como matéria-prima.

---

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A resistência da cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 nos processos de fermentação em batelada alimentada foi influenciada pela temperatura, sendo mais tolerante ao etanol nas menores temperaturas. A concentração máxima de etanol (P'máx) alcançada foi de 121 g/L a 20°C, 137 g/L a 25°C e 124 g/L a 32°C.
- A viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 empregando processo fermentativo em batelada repetida a 20°C se manteve constante em 92%, reutilizando as células por 3 vezes. O tempo de fermentação reduziu de 33 para 19 horas usando as mesmas condições de 180 g/L de sacarose, atingindo 11,7 °GL.
- As melhores faixas obtidas no planejamento fatorial fracionado pela técnica de superfície de respostas para as variáveis estudadas para operação em batelada alimentada foram: concentração de açúcares redutores totais de 200 a 260 g/L, concentração celular no inóculo de 15 a 30 g/L, temperatura 26 a 32°C e tempo de enchimento de 5 horas do reator. Essas faixas serviram de base para o planejamento composto central.
- No planejamento composto central a análise da influência das variáveis temperatura (24 – 34°C), concentração de ART (180 – 280 g/L), concentração celular no inóculo (10 – 35 g/L), em processo batelada alimentada com tempo de enchimento de 5 horas, resultou um ponto ótimo de 26°C, 240 g/L de açúcar redutor na alimentação e 35 g/L de concentração celular no inóculo.
- Os resultados das fermentações de validação do ponto ótimo indicaram que as equações de otimização fornecidas pelo planejamento composto central conseguiram descrever bem o comportamento do processo de fermentação, validando assim o modelo.
- A adaptação da levedura a 4°C implicou em excelentes resultados para fermentação conduzida a 24°C, com caldo de cana como substrato. O tempo de fermentação reduziu drasticamente, apresentou altos rendimento, viabilidade celular e produtividade.

---

## CAPÍTULO 6

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

---

Realizar experimentos de  $P'_{\max}$ , adicionando nutrientes, como fontes de nitrogênio e sais, durante a fermentação e com a levedura adaptada.

Avaliar a influência da relação C/N (carbono – nitrogênio) no mosto em relação a crescimento, rendimento e produtividade.

Avaliar a contaminação da fermentação em temperaturas mais baixas que as usuais empregando mosto industrial, formulado com caldo de cana e melaço.

Avaliar diferentes estratégias de alimentação no processo batelada alimentada.

Estudar o processo fermentativo iniciando a fermentação com valores de pH na faixa de 2,0 a 2,5 em baixas temperaturas empregando a levedura adaptada.

---

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALCOOLBRÁS, 2006. Revista Alcoolbrás. Edição nº 101. Abril 2006.

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.

ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros de fermentação alcoólica. 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

ALVES, J. G. L. F. Estudo da influencia da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos). Faculdade de engenharia de alimentos Universidade de Campinas. Campinas, 83 p., 1996.

AMORIM, H. V. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian Experience. *Sugar Journal* , v. 67, p. 11-14, 2005.

AMORIM, H. V. Ethanol Production in Brazil: a Successful History. In: SUGAR PROCESSING RESEARCH INSTITUTE CONFERENCE, 2006, Águas de São Pedro, SP. Louisiana: SPRI, 2006. v. 1, p. 44-47.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. *Visão Agrícola*, Piracicaba, v. 8, p. 34-37, 2008.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Os principais processos de fermentação para álcool combustível no mundo. *Guia Internacional do Alcool*, Ribeirão Preto, v. 1, p. 74-77, 2004.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

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

AMORIM, H.V.; LORENZI, M.S.; BOSCARIOL, F.C.; FERREIRA, G.M. Alto teor alcoólico e concentração de vinhaça: Processos se complementam. *News – Tecnologia Industrial*. p. 26-32, 2011.

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

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. Multiciência, Universidade de Campinas, 2006.

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

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

ATALA, D.I.P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. e MAUGERI FILHO, F.; Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros; Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.

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

BARGA, M. C., Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido. Dissertação-Programa Interdisciplinar de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; BASSO, L. C., Fisiologia e ecologia microbiana, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia microbiana, I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BELLUCO, A. E. S. 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.

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

CAMILI, E. A.; CABELLO, C.; CARDOSO, M. G. Produção de etanol de tratada com processo de flotação. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006.

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

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001a. p. 193-204. (Biotecnologia Industrial; v.2), 2001a.

COSTA, F. O Papel dos Microorganismos no Futuro dos Biocombustíveis. Instituto Nacional da Propriedade industrial, 2011.

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

CTC, 2012. Centro de Tecnologia Canavieira, Brasil. Disponível em <[www.ctcanavieira.com.br](http://www.ctcanavieira.com.br)>. Acesso em: 15/10/2014.

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

DEDINI S/A Indústrias de Base. Apresentação, 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.

DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; JESUS, C.D.F.; ROSSELL, C.E.V.; MARCIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Improving bioethanol production – Comparison between extractive and low temperature fermentation. Applied Energy 98, p. 548-555, 2012.

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.

EPE, 2013. Empresa de Pesquisa Energética, Brasil. Disponível em <<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Paginas/default.aspx>>. Acesso em 17/08/2014.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: Schmidell *et al.* (Coord). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 223-236, 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, E. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada alimentada. Tese (Mestrado), Universidade Federal de Campinas, 2005.

FINGUERUT, J.; MEIRELLES, A.J.A.; GUIRARDELLO, R.; COSTA, A. C. Fermentação, hidrólise e destilação. In: Biomassa para energia. CORTEZ, L.A.B.; LORA,E.E.S.; GÓMEZ, E.O. (Eds.). Editora da Unicamp: Campinas, p. 732, 2008.

FROHMAN, C. A.; ORDUÑA, R. M. Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* during traditional batch and fed-batch

alcoholic fermentations at constant sugar concentrations. *Food Research International*. p. 551-555, 2013.

GALASSI, G. R. Estudo do processo fermentativo contínuo para produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, 90 p., 2007.

GESEL – UFRJ, 2014. Disponível em: <http://www.gesel.ie.ufrj.br/>. Disponível em nov/ 2014.

GOES, T. A energia que vem da cana-de-açúcar. 2008. Disponível em <[www.embrapa.com.br](http://www.embrapa.com.br)>. Acesso em: mai. 2014.

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

GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. (Dissertação Mestrado) Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 206, 1988.

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.

GUIDINI, C. Z.; MARQUEZ, L. D. S.; SILVA, H. A.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E. J. Alcoholic Fermentation with Flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in Fed-Batch Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 131, n.6, 2013.

GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. *Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”*, Piracicaba, n.48, p. 55-69, 1991.

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

IEA – INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Renewables Information (2013 Edition). 2013. Disponível em : <http://www.iea.org/topics/renewables/>. Acesso em: mar.2014.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Proc. Biochemist.*, v.16, p. 42-49, 1981.

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.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43. (Biotecnologia Industrial; v.3)

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



- LORA, E.E.S, e VENTURINI, O. Biocombustíveis, (org). Interciência, 2012, v2, 1158p.
- LURTON, L. SNAKKERS, G. ROULLAND, C. GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. Journal of the Science of food and agriculture. V.67 p. 485-491, 1995.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brook, 10. ed. São Paulo, Brasil: Prentice Hall, 2004.
- McNEIL, B. e HARVEY, L. M. Fermentation – a practical approach. 1<sup>st</sup> ed. IRL PRESS at Oxford University Press. 1990.
- MDIC – MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMERCIO EXTERIOR. O futuro da indústria: biodiesel. Coletânea de artigos. Brasília: MDIC-STI/IEL, v.14, 145 p, 2006.
- MELO, H. F. Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial. Tese de Mestrado, Recife/PE, p. 118, 2006.
- MENEZES, T. J. B. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141-178, 1980.
- MISSAWA, S. K. Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional. 150 f. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Boletim mensal de combustíveis renováveis. 2014. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/>>. Acesso em: jul./2014.
- MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Governo aumenta etanol na gasolina. 2013. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/>>. Acesso em: mar.2014.
- MONACO, M. A. S. L. Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 64, 2007.
- MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renewable and Sustainable energy reviews. p. 888-903, 2015.
- 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.
- NOVACANA. As projeções de produção de cana, açúcar e etanol para a safra de 2023/2024 da Fiesp/MBagro, 2014. Disponível em < <http://www.novacana.com/estudos/projecoes-producao-cana-acucar-etanol-safra-2023-2024-fiesp-mb-agro/>>. Acesso em 18/11/2014.
- OLIVEIRA, K. F. Efeitos do ácido láctico adicionado sobre a produção de etanol em fermentações com reutilização de células a 34°C. 191 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I factors affecting the type of metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, v.26, n.6, p.1197-1212, 1974.

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.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, p.69-80, 2000.

PEREIRA J. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Rio de Janeiro: UFRJ, Escola de Química, 47 p. (Series on Biotechnology, v. 2), 2008.

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.

RIBEIRO, E. J. Apostila Açúcar e álcool. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2010.

RIBEIRO, E. 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.

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

ROMANÍ, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. *Bioresource Technology*. p. 150-158, 2015.

SANTOS, S.F.; BORSCHIVER, S.; SOUZA, V. Biocombustíveis: mercado, desafio e perspectivas. *Revista Brasileira de Engenharia Química*. V. 29, p.6-11, 2013.

SCHMIDELL, Willibaldo; FACCIOTTI, Maria Cândida Reginato. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 179-192. (*Biotecnologia Industrial*; v.2)

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

SILVA, A. S., WEBB, C., FILHO, E. X. F., BON, E. P. S., ELEUTHERIO, E. C. A., GOTTSCHALK, L. M. F., MOREIRA, L. R. S., PEREIRA, M. D., FERRARA, M. A., TEIXEIRA, R. S. S. Composição de enzimas, uso da composição na hidrólise enzimática de material lignocelulósico, processo de produção de enzimas que degradam a fração de polissacarídeos da biomassa, processo de produção de álcool utilizando a composição de enzimas. Patente publicada em 2009 sob o nº PI0705744-OA2.

SIQUEIRA, M. A. Proposta de Otimização para Destilarias Autônomas. *Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos*, p 33-38, maio/junho, 1993.

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

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

STEPHEN, J. D.; MABEE, W. E.; SADDLE, J. N. Will second generation ethanol be able to compete with first generation? Opportunities for cost reduction. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Chichester, v. 6, n. 2, p. 159–176, 2012.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry*, London, v.31, p.321-331, 1996.

TORIJA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M. MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, v.80, p.47,53, 2003.

UNICA (União da Indústria da Cana-de-açúcar), 2014. Disponível em <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 29/04/14.

VASCONCELOS, J. N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. *Brasil açucareiro*, Rio de Janeiro, p. 41-48, 1987.

VASCONCELOS, 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.

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

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.

WHEALS, A.E., BASSO, L. C., AMORIM, H. V., ALVES, D. M. G., Fuel ethanol after 25 years, Elsevier Science Ltd., v. 17, p.482 -486, 1999.

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

ZI, L.; LIU, C.; XIN, C.; BAI, F. Stillage backset and its impact on ethanol on ethanol fermentation by the flocculating yeast. *Process Biochemistry* 48, p. 753-758, 2013.

---

## CAPÍTULO 8

### APÊNDICE

---

**Apêndice (A1):** Curva de calibração para concentração celular

