



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



**Avaliação de condições operacionais na  
fermentação alcoólica VHG empregando  
diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

**Mariana Lopes Cruz**

UBERLÂNDIA – MG  
FEVEREIRO/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

# **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

Mariana Lopes Cruz

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro (UFU)

Coorientadores: Miriam Maria de Resende (UFU)

José Antônio Couto Teixeira (UM)

Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues (UM)

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

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO/2019

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

---

C957a  
2019 Cruz, Mariana Lopes, 1989-  
Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* [recurso eletrônico] / Mariana Lopes Cruz. - 2019.

Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro.

Coorientadores: Miriam Maria de Resende, José Antônio Couto Teixeira e Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.321>

Inclui bibliografia.

1. Engenharia química. 2. Álcool. 3. Fermentação. I. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1952- (Orient.). II. Resende, Miriam Maria de, 1971- (Coorient.). III. Teixeira, José Antônio Couto (Coorient.). IV. Domingues, Lucília Maria Alves Ribeiro (Coorient.) V. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

---

CDU: 66.0

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

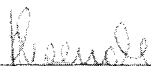
# AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA VHG EMPREGANDO DIFERENTES CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Tese de doutorado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química em 21 de fevereiro de 2019.

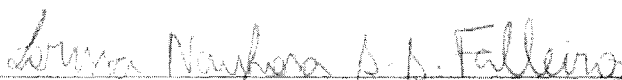
## BANCA EXAMINADORA



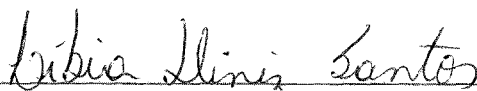
**Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**  
Orientador (PPGEQ/UFU)



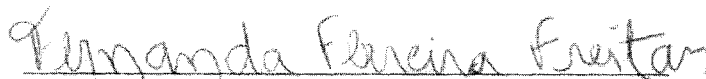
**Prof. Dra. Miriam Maria Resende**  
Co-Orientador (PPGEQ/UFU)



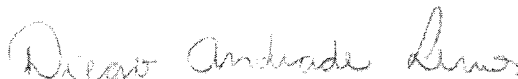
**Prof. Dra. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros**  
(FEQ/UFU)



**Prof. Dra. Líbia Diniz Santos**  
(PPGEA/UFU)



**Prof. Dra. Fernanda Ferreira Freitas**  
(PPGEQ/UFG)



**Prof. Dr. Diego Andrade Lemos**  
(ICTE/UFTM)

---

## AGRADECIMENTOS

---

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando, e agora no fim desta jornada não poderia deixar de reconhece-las e agradece-las.

Agradeço a Deus por esta conquista, por permitir, nestes tempos de desafios e aprendizados, adquirir conhecimento e amor pela pesquisa.

Tudo só foi possível graças ao apoio e amor da minha família.

Agradeço aos meus pais, Haimeé e Marcelo e a minha irmã Amanda, por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha avó Nininha pelas orações e toda a família pela torcida.

Ao meu namorado Felipe pelo apoio e carinho ao longo destes 6 anos de pós-graduação.

Aos meus amigos, por iluminar a minha vida, em especial ao Kayro.

Ao professor Eloízio e a professora Miriam pela orientação, amizade, confiança e permanente incentivo.

A Cecília, Silvino e Silvana e aos professores da FEQUI, pela paciência, dedicação e prontidão em atender e ajudar sempre que precisei.

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

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

Aos amigos e professores do Centro de Engenharia Biológica – CEB da Universidade do Minho – Portugal, especialmente aos professores Lucília Domingues e José Teixeira por propiciarem e contribuírem na construção deste Doutorado.

Aos amigos da cantina da Universidade do Minho que fizeram dos meus dias mais alegres durante a estadia em Braga- PT.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e pela bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) pelo período de doze (12) meses (processo 88881.131895/2016-01).

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

*“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”*

Chico Xavier

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 OBJETIVOS .....	9
1.1.1 Objetivos Específicos .....	9
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
2.1 ETANOL .....	11
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	15
2.2.1 Microrganismos .....	16
2.2.2 Matérias-primas .....	18
2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA VHG.....	22
2.4 FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO .....	24
2.4.1 Meio de cultura .....	24
2.4.2 Temperatura .....	28
2.4.3 pH e aeração .....	29
2.4.4 Concentração de inibidores e estresses .....	31
2.5 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	34
2.5.1 Batelada .....	35
2.5.2 Batelada alimentada .....	35
2.5.3 Contínuo .....	36
2.6 CONFIGURAÇÕES DE REATORES .....	37
2.6.1 Reator de tanque agitado (STR) .....	37
2.6.2 Reator Air-lift .....	38
<b>CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 MATERIAL.....	40













3.1.1 Locais de execução da pesquisa .....	40
3.1.2 Microrganismos .....	40
3.1.3 Meios de cultura.....	41
3.1.3.1 Meio de cultura do inóculo .....	41
3.1.3.2 Meio de fermentação.....	41
3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	41
3.2.1 Fermentações em bateladas repetidas .....	41
3.2.2 Fermentação VHG em reator Air-lift com FL-20.....	43
3.2.3 Estudo da influência conjunta da temperatura, concentrações de substrato e célula.....	44
3.3 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	47
3.3.1 Determinação das concentrações de açúcares e de etanol.....	47
3.3.2 Determinação da concentração de leveduras e viabilidade celular.....	47
3.3.3 Caracterização do caldo e melaço de cana-de-açúcar .....	48
3.3.4 Ensaio de floculação .....	49
3.4 CÁLCULOS RELACIONADOS ÀS FERMENTAÇÕES.....	49
3.4.1 Rendimento .....	49
3.4.2 Produtividade .....	50
3.4.3 Concentração de etanol expressa em porcentagem volumétrica % (v/v).....	50
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
4.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS TEMPOS DE FERMENTAÇÃO EM BATELADA PARA DIFERENTES TEMPERATURAS .....	51
4.2 FERMENTAÇÕES EM BATELADAS REPETIDAS COM DIFERENTES CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EM FERMENTAÇÕES VHG EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	54
4.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 .....	54
4.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ethanol Red .....	59
4.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-904.....	62
4.2.4 Comparação dos resultados obtidos para as cepas PE-2, Ethanol Red e Y-904.....	65

4.3 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA CONJUNTA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO E CÉLULA .....	67
4.3.1 Caracterização do caldo e melaço de cana-de-açúcar.....	67
4.3.2 Estudo da influência conjunta da temperatura, concentrações de substrato e célula.....	69
4.3.3 Experimento de validação.....	84
4.4 FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA REPETIDA COM ESTIRPE FLOCULANTE FL-20... ..	86
4.5 FERMENTAÇÃO VHG EM REATOR AIR-LIFT COM FL-20.....	88
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>94</b>
<b>CAPÍTULO 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>109</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 2.1</b> – Fluxograma da produção de açúcar e etanol (Fonte: CRUZ, 2015). ....	12
<b>Figura 2.2</b> – Série histórica de produção de etanol anidro e hidratado (Fonte: CONAB, 2017). .....	13
<b>Figura 2.3</b> – Aumento do teor alcoólico do vinho e benefícios em relação à vinhaça e consumo de vapor (Fonte: FERMENTEC, 2017). ....	15
<b>Figura 2.4</b> – Via metabólica da fermentação alcoólica em levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fonte: RODRIGUES et al., 2018 – Adaptado). ....	20
<b>Figura 2.5</b> – Curva de crescimento celular para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fonte: PIRES, 2017 - Adaptado). ....	25
<b>Figura 2.6</b> – Fatores estressantes que afetam as células de levedura na produção de etanol e mecanismos comuns de defesa celular (Fonte: LOPES et al., 2016 - Adaptado). ....	32
<b>Figura 3.1</b> – Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho. ....	40
<b>Figura 3.2</b> – Fermentação em frascos agitados. ....	42
<b>Figura 3.3</b> – Representação esquemática da unidade de trabalho (A) Meio de alimentação, (B) Bomba peristáltica, (C) Entrada de ar, (D) Ponto de amostragem, (E) Controle de temperatura e pH, (F) Saída de meio fermentado. ....	43
<b>Figura 3.4</b> – Fermentador New Brunswick Multigen operando em batelada alimentada. ....	45
<b>Figura 4.1</b> – Perfil de produção de CO <sub>2</sub> para  Ethanol Red,  Y-904 e  PE-2 na temperatura de 20°C .....	51
<b>Figura 4.2</b> – Perfil de produção de CO <sub>2</sub> para  Ethanol Red,  Y-904 e  PE-2 na temperatura de 23°C .....	52
<b>Figura 4.3</b> – Perfil de produção de CO <sub>2</sub> para  Ethanol Red,  Y-904 e  PE-2 na temperatura de 25°C .....	52
<b>Figura 4.4</b> – Perfil de produção de CO <sub>2</sub> para  Ethanol Red,  Y-904 e  PE-2 na temperatura de 27°C .....	53

<b>Figura 4.5</b> – Perfil de produção de CO <sub>2</sub> para —■— Ethanol Red, —●— Y-904 e —▲— PE-2 na temperatura de 30°C .....	53
<b>Figura 4.6</b> – Viabilidade final ao longo dos ciclos para as temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C para a estirpe PE-2.....	58
<b>Figura 4.7</b> – Viabilidade final ao longo dos ciclos para as temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C para a estirpe Ethanol Red.....	60
<b>Figura 4.8</b> – Viabilidade final ao longo dos ciclos para as temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C para a estirpe Y-904.....	64
<b>Figura 4.9</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função da concentração de substrato e da temperatura .....	71
<b>Figura 4.10</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função da concentração celular e da temperatura .....	72
<b>Figura 4.11</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função da concentração celular e da concentração de substrato .....	72
<b>Figura 4.12</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração de substrato e temperatura .....	73
<b>Figura 4.13</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular e temperatura .....	74
<b>Figura 4.14</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular e concentração de substrato .....	74
<b>Figura 4.15</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração de substrato e da temperatura.....	76
<b>Figura 4.16</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular e da temperatura .....	77
<b>Figura 4.17</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular e da concentração de substrato .....	77

<b>Figura 4.18</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração de substrato e da temperatura.....	78
<b>Figura 4.19</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular e da concentração de substrato .....	79
<b>Figura 4.20</b> – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular e da temperatura .....	80
<b>Figura 4.21</b> – Temperatura (° C) <i>versus</i> Concentração celular (%) da região ótima para as respostas Concentração de etanol —, Produtividade —, Rendimento — e Açúcar residual — .....	82
<b>Figura 4.22</b> – Temperatura (° C) <i>versus</i> Concentração de substrato (g/L) da região ótima para as respostas Concentração de etanol —, Produtividade —, Rendimento — e Açúcar residual — .....	83
<b>Figura 4.23</b> – Concentração celular (%) <i>versus</i> Concentração de substrato (g/L) da região ótima para as respostas Concentração de etanol —, Produtividade —, Rendimento — e Açúcar residual — .....	83
<b>Figura 4.24</b> – Perfis de concentração de etanol —●—, concentração celular —▲— e substrato —■— em função do tempo para o experimento de validação.....	85
<b>Figura 4.25</b> – Desempenho da cepa FL-20 em função de 8 ciclos fermentativo. ....	87
<b>Figura 4.26</b> – Perfis de concentração de etanol —●—, concentração celular —▲— e glicose residual —■— em função do tempo de operação no air-lift .....	89
<b>Figura 4.27</b> – Perfis de sedimentação da cepa floculante FL-20 ao final da fermentação na fase batelada e em contínuo no reator air-lift. ....	91

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 2.1</b> - Comparação na produção de etanol por diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes concentrações de substrato.....	17
<b>Tabela 2.2</b> – Características principais da produção de etanol no Brasil e EUA (Fonte: LOPES et al, 2016). .....	21
<b>Tabela 3.1</b> - Matriz do Delineamento Composto Central do efeito da temperatura, concentração celular e concentração de substrato (ART).....	46
<b>Tabela 4.1</b> – Respostas avaliadas em ciclos de fermentação em batelada repetida para diferentes temperaturas empregando a estirpe PE-2.....	55
<b>Tabela 4.2</b> – Respostas avaliadas em ciclos de fermentação em batelada repetida para diferentes temperaturas empregando a estirpe Ethanol Red. ....	59
<b>Tabela 4.3</b> – Respostas avaliadas em ciclos de fermentação em batelada repetida para diferentes temperaturas empregando a estirpe Y-904. ....	62
<b>Tabela 4.4</b> – Resumo da viabilidade e concentração de etanol a diferentes temperaturas para as cepas Ethanol Red, Y-904 e PE-2 .....	65
<b>Tabela 4.5</b> – Composições minerais do caldo e melaço de cana-de-açúcar .....	67
<b>Tabela 4.6</b> – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica (Fonte: AMORIM, 1977).....	65
<b>Tabela 4.7</b> – Variáveis utilizadas no DCCR e suas respostas em 30 horas de fermentação...	69
<b>Tabela 4.8</b> – Otimização do ponto ótimo.....	81
<b>Tabela 4.9</b> – Validação do ponto obtido no DCCR .....	85
<b>Tabela 4.10</b> – Parâmetros cinéticos de fermentação da estirpe floculante FL-20 em um sistema de repetição de lotes realizado em frascos agitados durante 8 ciclos. ....	86

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

ART	Açúcares redutores totais
$R^2$	Coefficiente de determinação
$t$	Tempo de fermentação
BP	British Petroleum
DCCR	Delineamento composto central rotacional
VHG	Very High Gravity - Alta concentração de açúcares fermentescíveis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia líquida de alta eficiência
$S_0$	Concentração de açúcares (ART) correspondente à concentração inicial em um processo operado em batelada
$X_0$	Concentração celular inicial correspondente à concentração inicial em um processo operado em batelada
T	Temperatura
P	Produto final - Concentração final de etanol
$Pr_{\text{etanol}}$	Produtividade de etanol
$Y_{P/S}$	Rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais consumidos
$C_{\text{etanol } f}$	Concentração de etanol ao final da fermentação
$C_{\text{ART } i}$	Concentração de açúcares redutores totais inicial correspondente à concentração inicial em um processo operado em batelada
$C_{\text{AR}}$	Concentração de açúcares residuais
°Brix	Escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis

---

## RESUMO

---

A aplicação de estratégias de engenharia de processo para o desenvolvimento de sistemas de fermentação de alta produtividade é considerada uma questão-chave na indústria do bioetanol. Uma estratégia para elevar o potencial de produção de etanol e minimizar os problemas gerados é a fermentação com teor alcoólico elevado, que pode ser realizada através da utilização de mostos mais concentrados em açúcares fermentescíveis (VHG). Esta tecnologia pode ser utilizada em escala industrial para a produção de etanol e apresenta vantagens como a obtenção de teores mais elevados de etanol e minimização dos custos de produção, em contraposição apontam novos desafios como minimizar os efeitos do estresse osmótico e alcoólico, a que as leveduras são submetidas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil fermentativo de três linhagens industriais; PE-2, Y-904, e Ethanol Red em processos de fermentação conduzidos em batelada repetida, a 20, 23, 25, 27 e 30°C e da levedura de característica floculante FL-20 em batelada repetida e em reator tipo air-lift, com ênfase às condições de fermentação VHG. Vinhos com teores de etanol variando de 16 a 18% (v/v) foram obtidos ao final das fermentações de mostos contendo 300 g/L de glicose pelas estirpes PE-2, Y-904, e Ethanol Red. O completo consumo da glicose e a manutenção da viabilidade celular em experimentos com reuso das células mostraram ser viáveis a aplicação da fermentação de mostos concentrados para a produção de etanol. Com a estirpe FL-20 estudada em batelada repetida em 8 ciclos consecutivos, com reciclo das células, obteve-se uma concentração média de etanol de 130 g/L, com uma produtividade final de 2,77 g /L.h. Entretanto, para o reator trabalhando em contínuo, o estado estacionário para a taxa de diluição de 0,03h foi atingido com valores altos de glicose residual e concentração de etanol abaixo do esperado, além de verificar perda da capacidade de floculação da levedura. Estudou-se também a influência conjunta da concentração de açúcar, concentração celular e temperatura na fermentação VHG em processo batelada alimentada, utilizando caldo e melaço de cana de açúcar, empregando a cepa Y-904. Foi observado que utilizando a condição gerada no Delineamento Composto Central (DCCR) que maximiza as variáveis estudadas (temperatura de 27°C, 300 g/L de concentração de substrato e 15 % de concentração celular), obteve-se um valor de produtividade de 4,42 g/L.h, 90% de rendimento e 135 g/L de etanol. As equações fornecidas pelo DCCR com coeficiente de determinação na faixa de 0,91 a 0,93; conseguem descrever bem o comportamento do processo de fermentação.

**Palavras-chave:** etanol; fermentação alcoólica VHG; influência da temperatura; fermentação com alto teor de etanol.

---

## ABSTRACT

---

The application of process engineering strategies for the development of high productivity fermentation systems is considered a key issue in the bioethanol industry. One strategy to increase the potential for ethanol production and to minimize the problems generated is the fermentation with high alcohol content that can be achieved through the use of more concentrated musts in total sugars (VHG). This technology can be used on an industrial scale for the production of ethanol and presents advantages such as obtaining higher levels of ethanol and minimizing production costs; in contrast they point to new challenges such as minimizing the effects of stress, osmotic and alcoholic, which yeasts are submitted. In this context, the present study aimed to study the fermentative profile of three industrial strains; PE-2, Y-904, and Ethanol Red in repeated batch fermentation processes at 20, 23, 25, 27 and 30 °C and flocculent yeast FL-20 in repeated batch and air-type reactor -lift, with emphasis on VHG fermentation conditions. Wines with ethanol contents varying from 16 to 18% (v/v) were obtained at the end of the fermentations of must containing 300 g/L of glucose by strains PE-2, Y-904, and Ethanol Red. The complete utilization of glucose and maintenance of cell viability in experiments with cell reuse showed that the fermentation of concentrated must for bioethanol production is feasible. With the FL-20 strain studied in repeated batch cycles in 8 consecutive cycles with cell recycling, a mean ethanol concentration of 130 g/L was obtained, with a productivity of 2.77 g/L.h. However, for the continuous reactor, the steady state for the dilution rate of 0.03h was reached with high values of residual glucose and ethanol concentration below that expected, in addition to the loss of flocculation capacity of the yeast. The influence of sugar concentration, cell concentration and temperature on VHG fermentation in a batch process fed with sugar cane molasses and broth was studied using the strain Y-904. It was observed that using the condition generated in the Central Compound Design (DCCR) that maximizes the studied variables (temperature of 27°C, 300 g/L of substrate concentration and 15% of cellular concentration), a productivity value of 4.42 g/Lh, 90% yield and 135 g/L ethanol. The equations provided by the DCCR with coefficient of determination in the range of 0.91 to 0.93; to describe the behavior of the fermentation process.

**Key-words:** ethanol; VHG alcoholic fermentation; temperature influence; alcoholic fermentation with high ethanol concentration.

---

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

---

Nos últimos anos, a conversão da biomassa em etanol combustível ganhou mais atenção devido a crescente crise de energia, alta no preço do petróleo e questões ambientais (UNICA, 2018). Uma ampla gama de substratos, tanto de sacarina como de amido, tem sido utilizados para a produção de etanol. No Brasil, a principal fonte de matéria-prima empregada na produção de etanol é a cana-de-açúcar. A cana se destaca como a principal matéria-prima utilizada na fermentação alcoólica, devido a sua disponibilidade e custo, bem como por ser uma fonte rica de carbono com elevada concentração de açúcares, além de possuir o método de produção de etanol mais simplificado, pois a fermentação ocorre de maneira direta, sem necessitar de outras etapas químicas ou biológicas de preparo do substrato (NIGAM e SINGH, 2011; FERMENTEC, 2017).

Diversos estudos científicos no campo microbiológico têm sido cruciais para a evolução da indústria de etanol no Brasil, como por exemplo, o aprimoramento e desenvolvimento de novos processos de fermentação, seleção de linhagens robustas de levedura industrial, melhor controle de contaminantes bacterianos, melhoria do controle químico e microbiológico nas destilarias. Atualmente, novas fronteiras científicas e tecnológicas são enfrentadas pela indústria para melhorar o processo de fermentação da produção de etanol no Brasil (AMORIM et al., 2010; FERMENTEC, 2018).

A fermentação alcoólica pode ser melhorada por meios de processos de otimização e seleção de microrganismos robustos (PEREIRA et al., 2012). Um importante campo de pesquisa em fermentação alcoólica é a busca por novas linhagens de leveduras com alta tolerância a temperatura e etanol, e capazes de produzir vinhos fermentados de alta concentração alcoólica bem como identificar os fatores relacionados à condição atual de processo que impedem a condução do processo de fermentação no limite da álcool tolerância das leveduras industriais. A conjugação desses fatores numa linhagem de levedura seria bastante atrativa na medida que produziria redução no consumo de água de resfriamento, redução no volume de vinhaça além de redução de consumo de energia na destilaria como um todo (MIRANDA Jr. et al., 2009).

Uma das estratégias de processo atualmente aplicadas na indústria de fermentação é a tecnologia de fermentação de alta concentração de açúcares fermentescíveis (VHG). Esta técnica traz uma série de benefícios potenciais sobre as abordagens convencionais, incluindo: considerável economia de água, maior produtividade de etanol, redução de custos associados

com o tratamento do efluente (vinhaça), bem como uma considerável economia de energia na etapa de destilação, menor custo de capital e também minimização na contaminação bacteriana. Esta tecnologia proporciona um aumento da produção sem grandes investimentos e alterações nas instalações existentes e têm sido amplamente empregada para a produção de etanol (QIU e JIANG, 2017; AUESUKAREE, 2017).

Vários fatores desempenham um papel importante na diminuição da eficiência e desempenho da fermentação alcoólica pelas leveduras. Os fatores mais importantes que contribuem para o aumento do estresse na fermentação alcoólica são: inibição pelo produto final, o etanol e alguns sub-produtos tais como ácidos orgânicos; pressões osmóticas resultantes de altas concentrações de açúcar; temperaturas elevadas; diminuição do crescimento celular devido à falta de aeração; contaminação por bactérias; inibição da fermentação devido a instabilidade da cepa que conduz a formação de mutações/variantes. De todos estes fatores, o efeito inibitório do etanol sobre as células da levedura é considerado o fator mais importante na fermentação alcoólica (BAI et al., 2008).

O aumento da tolerância da levedura ao etanol pode resultar na obtenção de vinhos com altos teores alcoólicos. Isso permite a otimização do uso de fermentadores e equipamentos para realização da fermentação. Além disso, possibilita diminuir a vinhaça gerada e minimizar os impactos ambientais pelo uso desse resíduo (VITOR, 2014).

Baseado na importância de se obter vinhos com maiores teores de etanol este trabalho estudou o comportamento de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e fatores inibitórios associados às fermentações VHG em diferentes condições operacionais.

## 1.1 OBJETIVOS

Com base no exposto tem-se como objetivo geral do presente trabalho estudar o processo de fermentação alcoólica com altas concentrações de açúcar (VHG) empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.1.1 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos têm-se:

- Avaliar o desempenho das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* : Y-904, Ethanol Red e PE-2 em batelada repetida, em condições VHG, na faixa de temperatura de 20 a 30°C;

- Estudar o comportamento da levedura de característica floculante FL-20, em situação VHG em fermentações sucessivas a 30°C;
- Avaliar o desempenho da levedura FL-20, de característica floculante, na fermentação alcoólica VHG em reator air-lift;
- Caracterizar caldo de cana e melaço da fabricação de açúcar em termos de concentrações de açúcares e sais;
- Estudar a influência conjunta da concentração de açúcar, concentração celular e temperatura na fermentação VHG em processo batelada alimentada, utilizando caldo e melaço de cana de açúcar empregando a cepa Y-904.

---

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre os temas pertinentes a este trabalho, dando ênfase para a fermentação alcoólica utilizando a tecnologia VHG.

#### 2.1 ETANOL

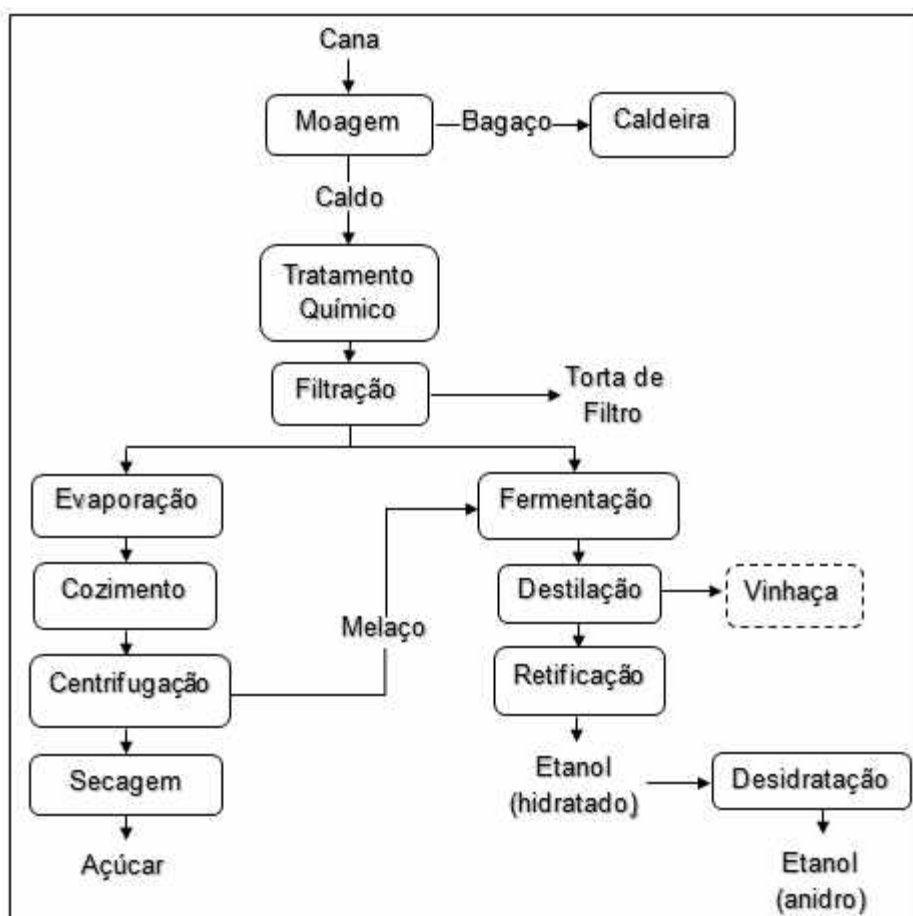
O etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis que contribui para a redução das emissões de dióxido de carbono, além de ser uma alternativa aos problemas energéticos no mundo em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, tendo em primeiro lugar os Estados Unidos (NOVACANA, 2018; IBETO et al., 2011).

A produção industrial de etanol ocorre principalmente por via fermentativa. Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação mais econômica é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país. Qualquer matéria que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima para obtenção de etanol, o qual é produzido principalmente por meio da conversão de açúcares, de amido ou celulose (AQUARONE et al., 2001; SZWARC, 2010).

Nas destilarias brasileiras, o etanol é produzido pela fermentação de mostos preparados a partir da mistura de caldo de cana-de-açúcar ou água e melaço em diferentes proporções, de modo a se obter uma concentração total de açúcares fermentescíveis de cerca de 20°Brix (180 g/L de sacarose, considerando 90% de pureza) (BASSO et al., 2011).

O melaço de cana é um subproduto da produção de açúcar, apresenta em sua composição, água, carboidratos fermentescíveis (cerca de 45-60% de sacarose e 5-20% de glicose e frutose), compostos não açucarados de origem orgânica (aminoácidos, vitaminas e proteínas) e minerais (BASSO et al., 2011).

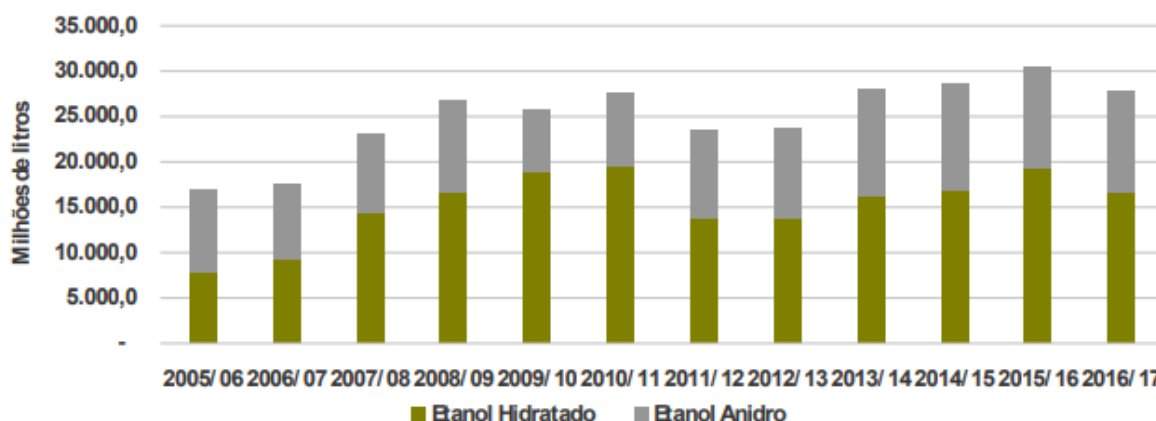
O processo integrado de produção de açúcar e etanol é o mais empregado pelas indústrias sucroenergéticas no Brasil. Cerca de 70% das instalações industriais são plantas produtoras de açúcar com destilarias anexas e as demais são destilarias autônomas (HENDLER, 2011). A Figura 2.1 ilustra como as partes deste sistema se relacionam.



**Figura 2.1** – Fluxograma da produção de açúcar e etanol (Fonte: CRUZ, 2015).

A partir do bagaço gerado pelo processamento da cana, é possível produzir energia, utilizada para alimentar a própria usina. O excedente é vendido para as concessionárias e, com essa contribuição, a cana-de-açúcar se tornou a principal fonte de energia renovável, responsável por 17,5% da matriz energética brasileira, superior à fonte hidráulica (12,6%) e atrás apenas de petróleo e derivados (36,5%) (NOVACANA, 2018).

O etanol desempenha um papel importante na economia brasileira, pois pode ser utilizado como combustível nos veículos flex-fuel (hidratado), misturado com a gasolina (anidro), com vista a baratear o combustível, aumentar sua octanagem e reduzir a emissão de poluentes, além da utilização do etanol anidro na fabricação de tintas, vernizes, solventes, etc (NOVACANA, 2018). O fechamento da produção brasileira de etanol anidro na safra 2016/17, foi de 11,07 bilhões de litros, produção 1,2% inferior à safra passada, que foi de 11,21 bilhões de litros (Figura 2.2) (CONAB, 2017).



**Figura 2.2** – Série histórica de produção de etanol anidro e hidratado (Fonte: CONAB, 2017).

Apesar do aumento no consumo de gasolina no ano de 2016, os preços favoráveis do açúcar incentivaram a produção desta *commodity* em detrimento ao etanol. O etanol hidratado teve uma redução na sua produção tendo vista que, além de destinarem uma parcela maior da moagem para produção de açúcar, houve uma queda forte na sua demanda, por conseguinte, o etanol anidro se tornou mais vantajoso devido os preços tenderem a ser mais remuneradores. Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), o consumo de gasolina aumentou 5,5% (2,29 bilhões de litros) na safra 2016/17 em relação ao mesmo período da safra 2015/16, enquanto o consumo de etanol hidratado caiu 21,1% (3,67 bilhões de litros) (CONAB, 2017).

No Brasil a maior parte do etanol é produzido por um processo de fermentação em batelada alimentada com reciclo de fermento (em torno de 80% do total). O restante do etanol é produzido por fermentação contínua multiestágio com reciclo de fermento. Os parâmetros característicos da fermentação, atualmente, são: rendimento de conversão de açúcar acima de 90%, atingindo 91% em algumas usinas; os títulos de etanol no vinho atingem 8 – 9 °GL; tempos de fermentação de 6 a 11 horas; concentração de fermento no vinho final típica de 13% v/v e volume final de vinhoto após destilação 12 – 15 litros/litro de etanol (NOVACANA, 2018).

De acordo com Alves (2015), no Brasil, devido a grande demanda pelo uso do etanol, têm-se uma intensa produção deste biocombustível, e bilhões de litros de vinhaça, são gerados diariamente no país.

A vinhaça é o principal, e mais crítico, subproduto da agroindústria sucroenergética. Obtida através da destilação do vinho, esse resíduo é produzido na relação aproximada de 12/1, ou seja, 12 litros de vinhaça para cada litro de etanol fabricado (FERMENTEC, 2015).

O uso da vinhaça para fertirrigação da cana-de-açúcar é reconhecidamente uma boa prática agrícola do ponto de vista ambiental e produtivo, pois permite a reciclagem de minerais, economia com fertilizantes à base de potássio, aumento da fertilidade do solo e redução da captação de água para irrigação. Entretanto, devido ao acúmulo de íons pela aplicação contínua da vinhaça nas mesmas áreas por diversos anos, assim como dos riscos de lixiviação e contaminação de lençol freático, as legislações atuais restringem o uso da vinhaça em solos onde a concentração de potássio (camada 0-80 cm) seja superior a 5% da CTC – Capacidade de Troca de Cátions. Isso levou à necessidade de distribuir a vinhaça em áreas mais distantes, elevando os custos de transporte e aplicação (AMORIM et al., 2015).

A construção de canais que cortam áreas férteis por dentro do canavial, a impermeabilização de reservatórios, o uso de caminhões, a aquisição e o dimensionamento de bombas e de tubulações para atender a vazões elevadas, a manutenção e os prejuízos causados pela corrosão da vinhaça acabaram aumentando os custos das usinas, os quais estão diretamente relacionados com o volume de vinhaça, o raio médio do canavial e as formas utilizadas para armazenamento, transporte e sua aplicação no campo (NETO, 2016).

Por sua vez, o volume de vinhaça produzido pela indústria está diretamente relacionado ao teor alcoólico do vinho. Um pequeno aumento no teor alcoólico das fermentações pode gerar uma economia significativa com a vinhaça (AMORIM, 2015).

Um novo processo de fermentação alcoólica, intitulada como tecnologia VHG (Very High Gravity), sigla em inglês que faz referência à alta concentração de açúcares no caldo fermentativo, possui ganho de eficiência de até 7%. Trata-se de uma fermentação alcoólica com reciclo de células, voltada à obtenção de vinhos de alto teor alcoólico, 16% em volume. A produção de vinhaça durante a fermentação VHG é reduzida em 60% devido à maior taxa de conversão alcóolica. Isso diminui o custo de produção de etanol entre 5 e 7% (CTBE, 2014).

A Figura 2.3 ilustra os custos e a economia em função da elevação do teor alcoólico e da redução do volume de vinhaça para uma usina que produz 120.000 m<sup>3</sup> de etanol por safra.

Parâmetros avaliados	Teor alcoólico no vinho (%)				
	8	10	12	14	16
Produção de etanol na safra (L)	120.000.000	120.000.000	120.000.000	120.000.000	120.000.000
Volume de vinhaça (L)	1.485.104.795	1.186.494.221	987.664.158	845.786.645	739.470.622
L vinhaça / L etanol	12,38	9,89	8,23	7,05	6,16
Custo de aplicação vinhaça (R\$)	11.583.817,40	9.254.654,93	7.703.780,44	6.597.135,83	5.767.870,85
Consumo de vapor na safra (Kg)	313.002.358	258.751.793	221.483.698	194.194.155	173.288.213
Consumo de vapor kg/L etanol)	2,61	2,16	1,85	1,62	1,44
Custo vapor (R\$)	2.880.400,31	2.253.616,98	1.863.012,91	1.594.682,62	1.398.197,92
Custo Total (R\$)	18.352.172,85	13.837.434,38	11.117.667,84	9.298.463,06	7.995.333,75
Vinhaça + vapor					

**Figura 2.3** – Aumento do teor alcoólico do vinho e benefícios em relação à vinhaça e consumo de vapor (Fonte: FERMENTEC, 2017).

Elevar o teor alcoólico diminui o consumo de vapor na destilaria, que, em média, são consumidos 2,61 kg vapor/L etanol para um teor alcoólico de 8% no vinho. Isso representa um consumo de 241 mil toneladas de vapor por safra, para uma destilaria com capacidade de produção para 500 m<sup>3</sup> de etanol/dia (FERMENTEC, 2017).

Os gastos com insumos, como os antibióticos, também diminuem, pois, se houver contaminação, a resistência da bactéria em uma concentração mais elevada de etanol será menor. Esse efeito sobre as bactérias pode ser explicado pelo efeito sinérgico entre o etanol e o ácido succínico produzidos pelas leveduras. Há, também, economia de água no tratamento do fermento. Outro ponto positivo é a diminuição do consumo de bagaço, dessa forma, haverá excedente que poderá ser vendido ou utilizado para cogeração de eletricidade. Outros benefícios decorrentes da tecnologia VHG são: aumento do rendimento fermentativo; menor quantidade de centrífugas utilizadas, devido ao menor volume de vinho processado para a mesma produção, fazendo com que haja, também, economia de energia e ganhos de produtividade, pois será possível produzir mais álcool por m<sup>3</sup> de dorna (FERMENTEC, 2015).

## 2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O processo fermentativo por leveduras, para obtenção de etanol, é conhecido e amplamente utilizado. O etanol é essencialmente produzido através dos processos de fermentação alcoólica e destilação. A principal característica que distingue o processo

brasileiro de outros bioprocessos em todo o mundo é a reciclagem de células da levedura (WHEALS et al., 1999).

Fermentações industriais são realizadas com alta densidade de células, em grandes fermentadores e em curtos períodos. Aproximadamente, 85% de todas as destilarias brasileiras utilizam o processo de fermentação em batelada alimentada, enquanto os restantes 15% executam fermentações contínuas (FINGUERUT, 2004; GODOY et al., 2008). Além disso, caldo de cana, melaço diluído com água e uma mistura de caldo e melaço são os principais substratos para fermentação (FERMENTEC, 2018).

A fermentação é realizada principalmente pela *Saccharomyces cerevisiae*, onde em condições anaeróbias os açúcares como a glicose e a frutose (que são oriundos do caldo de cana-de-açúcar ou proveniente da hidrólise da sacarose) são convertidos por processo denominado glicólise. A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica na qual, para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula e, em condições anaeróbias, o piruvato é ainda reduzido a etanol com a liberação de CO<sub>2</sub> (BAI et al., 2008).

### 2.2.1 Microrganismos

Apesar de muitos microrganismos terem sido explorados para a produção de etanol, a levedura *S. cerevisiae* é o microrganismo mais amplamente utilizado em grande escala para fermentação e produção do etanol devido à sua capacidade de fermentar uma vasta gama de açúcares e desenvolver os mecanismos adequados para lidar com as condições de estresses encontrados nos processos de VHG (BAI et al., 2008).

A introdução da técnica da cariotipagem das leveduras, a partir da década de 90, foi um marco para a evolução da tecnologia da fermentação alcoólica. Esta técnica permitiu identificar quais leveduras estavam no processo e ficou demonstrado que algumas linhagens desaparecem dos fermentadores, enquanto outras leveduras dominam a fermentação. Complementar à cariotipagem, o DNA mitocondrial foi outro avanço importante para descobrir a origem das leveduras, seus parentescos, e verificar as mudanças que elas sofrem com o tempo (FERMENTEC, 2018).

O desenvolvimento de cepas de leveduras mais tolerantes a estresses relevantes para fermentações VHG irá necessariamente melhorar o desempenho destes processos e contribuir para o desenvolvimento da indústria de etanol. Pereira et al. (2011), identificaram genes necessários para a resistência simultânea das leveduras a um alto número de estresses

relacionados à fermentação. Os genes de leveduras descritos na análise fenotípica em grande escala como sendo necessários para a máxima tolerância ao etanol (TEIXEIRA et al., 2009) e altas concentrações de glicose (como os encontrados em meios de crescimento industrial) (TEIXEIRA et al., 2010) foram comparados. Um conjunto de genes que confere resistência a altas concentrações de glicose, ácido acético e etanol, estresses relevantes para fermentações de VHG foram identificados. A análise comparativa do desempenho fermentativo sob condições industrialmente relevantes, permitiu diminuir o número de genes cuja expressão é necessária para o desempenho máximo de fermentações VHG, revelando candidatos adequados para posterior engenharia genética, a fim de obter linhagens de leveduras industriais mais robustas.

Cepas de levedura *S. cerevisiae* que são usadas na produção de etanol estão resumidas na Tabela 2.1, por diferentes substratos e em diferentes concentrações.

**Tabela 2.1** - Comparação na produção de etanol por diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de substrato.

CEPA	SUBSTRATO	So (g/L)	T (°C)	P (g/L)	REFERÊNCIA
<i>S. cerevisiae</i> AT-3	Glicose	180	40	68,5	Tofighi et al. (2014)
<i>S. cerevisiae</i> SEMF1	Caldo de sorgo sacarino	185	33	86,2	Zhao et al. (2012)
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2034	Caldo de sorgo sacarino	200	30	70,6	Phutela e Kaur (2014)
<i>S. cerevisiae</i> KKU-VN8	Caldo de sorgo sacarino	238	40	89,3	Techaparin et al. (2017)
<i>S. cerevisiae</i> CCTCC M206111	Batata doce	240	30	128,5	Zhang et al. (2011)
<i>S. cerevisiae</i> Y-904	Sacarose	240	26	114,0	Cruz et al. (2018)
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	Glicose	323	30	149,0	Gomes et al. (2012)
<i>S. cerevisiae</i> KL17	Galactose e glicose	500	30	96,9	Kim et al. (2014)

Diferentes tipos de matérias-primas foram reportadas para a produção de etanol. Kim et al. (2014), relataram a maior concentração de etanol de 96,9 g/L com produtividade de 3,46 g/ L.h. A fermentação foi realizada pela estirpe de levedura do tipo selvagem *S. cerevisiae* KL17 que é capaz de utilizar simultaneamente glucose e galactose. Isso mostra que as leveduras do tipo selvagem têm alto potencial na fermentação de açúcares para etanol. Além disso, Gomes et al. (2012) e Cruz et al. (2018) relataram que cepas do tipo comercial podem ser mais eficientes para o processo industrial do que cepas laboratoriais.

*Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura bastante utilizada para estudar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao estresse. Pesquisas em fisiologia de levedura revelaram que muitas cepas de *S. cerevisiae* podem tolerar concentrações de etanol muito maiores do que se acreditava anteriormente, geralmente sem qualquer modificação genética ou condicionante (PEREIRA et al. 2011).

A utilização de leveduras de característica floculante poupa o investimento na aquisição e manutenção das centrífugas, bem como o consumo de energia para a operação das mesmas, sendo assim uma operação no processo considerada ambientalmente correta. A floculação é uma propriedade importante das leveduras, e é normalmente definida como a capacidade das células de se agregarem espontaneamente e formar flocos que são facilmente sedimentados ao final da fermentação de forma eficaz, dispensando a utilização de centrífugas que são amplamente utilizadas na recuperação das células de levedura livres (BAI et al., 2008; ANDRIETTA et al., 2008; MA e LIU, 2010; CHOI et al., 2010).

A floculação de leveduras apresenta outras vantagens, como a utilização de reatores de alta densidade celular, o que conduz à produtividade elevada e tempos mais curtos de fermentação e também o uso de diferentes configurações de reatores (DOMINGUES, 2001; SOARES, 2010). Leveduras floculantes têm sido tradicionalmente utilizadas pelas indústrias cervejeiras e de vinho, sendo esse processo bem conhecido e desenvolvido. Porém a sua aplicação em outras indústrias biotecnológicas, como em processos de fermentação alcoólica, ainda necessita de novos avanços (TEIXEIRA et al., 1995, MA e LIU, 2010).

### 2.2.2 Matérias-primas

O custo do substrato na fermentação influencia significativamente a economia da produção de etanol. Na tecnologia de fermentação VHG, além do menor investimento, custos de operação e redução da demanda de energia, o uso de insumos econômicos pode reduzir ainda mais os custos e melhorar a economia da produção de etanol. Uma ampla gama de substratos, tanto de sacarina como de amido, tem sido utilizada para a produção de etanol VHG. Do ponto de vista de fermentação, as matérias-primas podem ser agrupadas em diretamente fermentescíveis, que não necessitam de conversão prévia do carboidrato e as indiretamente fermentescíveis, que precisam sofrer conversão prévia do carboidrato antes da fermentação, de modo a torná-lo assimilável pela levedura (MENEZES, 1980).

O açúcar é a matéria-prima que possui o método de produção de etanol mais simplificado, pois a fermentação ocorre de maneira direta, sem necessitar de outras etapas

químicas ou biológicas de preparo do substrato. Já o amido, pelo fato de ser um polissacarídeo, necessita de pré-tratamento, como cozimento e hidrólise enzimática, a fim de formar monossacarídeos os quais serão fermentados até a formação do etanol. Por fim, o material lignocelulósico, assim como o amido, também é um polissacarídeo e necessita da hidrólise enzimática ou química para a formação de monossacarídeos fermentáveis para a produção de etanol (NIGAM e SINGH, 2011; BALAT e BALAT, 2009).

No Brasil, a principal fonte de matéria-prima empregada na produção de etanol é a cana de açúcar. A cana se destaca como principal substrato utilizado na fermentação alcoólica, devido a sua disponibilidade e custo, bem como por ser uma fonte rica de carbono com elevada concentração de açúcares. Além disso, estudos comprovam que a cana possui maior produtividade anual em etanol por área colhida, se comparada a outras fontes de açúcares (ATALA, 2004).

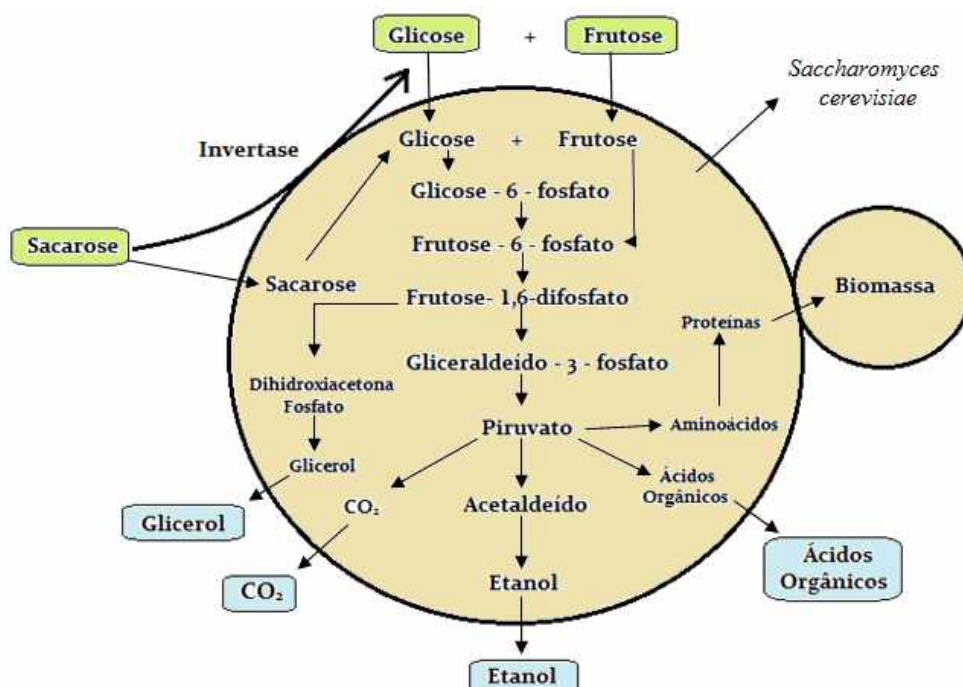
A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de etanol no Brasil, não se restringe somente ao caldo da cana de açúcar. O mel final, ou melaço, é um subproduto da produção do açúcar e também é utilizado associado ao caldo da cana-de-açúcar ou simplesmente diluído como substrato do processo fermentativo (SCHMIDELL, 2005).

A cana-de-açúcar é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e aos respectivos subprodutos. Além da produção de etanol e açúcar, as unidades de produção têm buscado operar com maior eficiência, inclusive com geração de energia elétrica, auxiliando na redução dos custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade. Nesse contexto, a agroindústria sucroenergética mostra-se muito favorável devido ao esgotamento das jazidas petrolíferas e ao elevado preço da extração do petróleo. Ademais, de modo geral, há conscientização das pessoas em relação ao meio ambiente, sobre os efeitos indesejáveis da utilização de combustíveis fósseis no balanço de carbono na atmosfera e aos efeitos desastrosos do aquecimento da superfície terrestre. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo grande importância para o agronegócio brasileiro. O aumento da demanda mundial por etanol oriundo de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um país promissor para a exportação dessa *commodity* (CONAB, 2017).

Quando se considera o substrato formado de sacarose, juntamente com pequenas porcentagens de glicose e frutose, como na indústria brasileira de etanol, em que se utiliza caldo da cana-de-açúcar, melaço ou a associação dos dois, o açúcar é definido como açúcar

reductor total (ART) e o rendimento estequiométrico da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de ART. Quando o rendimento estequiométrico é calculado com base na sacarose o valor do mesmo é 0,538 g de etanol por grama de sacarose (BAEYENS et al., 2015). Na prática industrial o rendimento da fermentação alcoólica bem conduzida atinge de 90 a 92% do rendimento estequiométrico, havendo um consumo de açúcar para formação de biomassa celular e subprodutos (LIMA et al., 2001).

A Figura 2.4 ilustra um esquema simplificado da via metabólica da fermentação alcoólica. Primeiro, a sacarose é convertida em glicose e frutose na reação de hidrólise catalisada pela enzima invertase intra e extracelularmente (BAEYENS et al., 2015). Posteriormente, glicose e frutose são convertidos em piruvato durante a glicólise, e o piruvato é convertido em etanol e CO<sub>2</sub> em um processo de duas etapas. Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado e o acetaldeído é formado. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido a etanol (NELSON e COX, 2008). A fermentação também produz biomassa celular e outros produtos como glicerol (KUTYNA et al., 2012) e ácidos orgânicos (RAMON-PORTUGAL et al., 1999).



**Figura 2.4** – Via metabólica da fermentação alcoólica em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: RODRIGUES et al., 2018 – Adaptado).

O Brasil e EUA são os maiores produtores de etanol do mundo, produzindo cerca de 94 bilhões de litros de etanol por ano, o que representa cerca de 85% da produção mundial

(BERTRAND et al., 2016). No entanto, existem grandes diferenças nos processos de fermentação (Tabela 2.2). Além da matéria-prima, a principal diferença é a reciclagem das células de levedura.

**Tabela 2.2** – Características principais da produção de etanol no Brasil e EUA (Fonte: LOPES et al., 2016).

CARACTERÍSTICAS	EUA	BRASIL
<b>Matéria-prima principal</b>	Milho	Cana-de-açúcar
<b>Processo de fermentação</b>	Sem reciclo de levedura	Com reciclo de levedura
<b>Sólidos em suspensão</b>	> 30%	< 1%
<b>Rendimento da fermentação</b>	85 – 90%	90 – 92%
<b>Tempo de fermentação</b>	54 – 72 horas	6 – 12 horas
<b>Concentração de levedura</b>	3 – 4 %	8 – 12%
<b>Concentração de etanol</b>	12 – 18% (v/v)	7 – 12% (v/v)
<b>Operação da usina</b>	345 dias	200 – 240 dias
<b>Principal sub-produto</b>	DDGS para alimentação animal	Vinhaça para fertirrigação

O processo de etanol a partir do milho se diferencia do de cana-de-açúcar pelas etapas de gelatinização e hidrólise do amido. A etapa de fermentação ocorre juntamente com a quebra do amido, dificultando o reciclo de leveduras. Por esse motivo são usadas baixa concentração de inóculo inicial (3 – 4%) , pois é necessário o preparo de um novo inóculo a cada ciclo. A inconveniência desse procedimento é o tempo prolongado das fermentações (54 – 72 horas) quando comparados aos tempos de fermentações das destilarias brasileiras (6 – 12 horas) que começam com concentrações celulares mais altas (8 – 12%, v/v). No entanto, as fermentações de milho atingem maiores concentrações de etanol (12 – 18%, v/v) em comparação aos processos brasileiros (7 – 12%, v/v) (LIMA et al., 2001).

O etanol de milho pode ser produzido em usinas que utilizam apenas essa matéria-prima, e também pode ser feita de forma integrada com a cana-de-açúcar, em usinas chamadas “flex”. Essa última opção tem a vantagem de aproveitar o período de ociosidade da produção de cana, ao final da safra (ÚNICA, 2018).

A produção de etanol a partir do milho oferece vantagens na facilidade de armazenamento, uma vez que os grãos de milho podem ser armazenados por várias semanas,

as fermentações podem ser realizadas durante 345 dias por ano, enquanto as destilarias brasileiras executam seus processos por 200 a 240 dias. Diferentemente dos grãos de milho, a cana-de-açúcar precisa ser esmagada logo após a colheita, para evitar perdas causadas por contaminação microbiana (WHEALS et al., 1999).

O principal co-produto das fermentações do milho é o DDGS (grãos de destilaria secos com solúveis), apesar de ser chamada de co-produto, o DDGS possui alto valor agregado. Rico em proteínas, é amplamente utilizado em ração animal para bovinos, suínos, aves e peixes e pode substituir 100% do farelo de soja e 50% do farelo de milho na fabricação da ração (FERMENTEC, 2017).

Por outro lado, as destilarias brasileiras geram enormes volumes de vinhaça, rica em potássio, utilizada na fertirrigação da cana-de-açúcar, reduzindo os custos com fertilizantes (PRADO et al., 2013).

### 2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA VHG

A aplicação de estratégias de engenharia de processo para o desenvolvimento de sistemas de fermentação de alta produtividade é agora considerada uma questão-chave na indústria de etanol. Uma estratégia para elevar o potencial de produção de etanol e minimizar os problemas gerados é a fermentação com teor alcoólico elevado, que pode ser realizada através da utilização de mostos mais concentrados em açúcares totais. Este processo é conhecido como tecnologia de fermentação de mosto com alto teor de açúcares fermentescíveis, da tradução do inglês Very High Gravity (VHG). Na fermentação de etanol, 1 mol de glicose é convertido em 2 mol de etanol e 2 mol de dióxido de carbono. Portanto, um meio contendo uma maior concentração de açúcar obterá uma maior concentração de etanol. Geralmente, as concentrações de açúcar para a fermentação do etanol podem ser divididas em gravidade normal (NG) (<180 g/L de açúcar total), alta gravidade (HG) (180 – 250 g/L de açúcar total) e gravidade muito alta (VHG) condições ( $\geq 250$  g/L de açúcar total) (BAI et al., 2008; DEESUTH et al., 2015).

A fermentação HG foi proposta na década de 1980 e comercializada com sucesso a partir de então, fazendo com que a concentração final de etanol aumentasse drasticamente do nível anterior de 7 – 8% (v/v) para o valor atual de 10 – 12% (v/v) (ARSHAD et al., 2017). Assim, a fermentação VHG usando o meio contendo açúcar acima de 250 g/L para alcançar mais de 15% (v) de etanol foi proposta na década de 1990. Thomas et al. (1993) definiram a tecnologia de fermentação de VHG como fermentação de meios contendo 27 gramas ou mais

de sólidos dissolvidos por 100 mililitros da mistura. No entanto, estas fermentações raramente são concluídas devido a alterações fisiológicas nas células microbianas (WANG et al., 1999; BAI et al., 2004a, b).

A aplicação da tecnologia de fermentação de alta concentração de açúcares (VHG) é uma técnica que traz uma série de benefícios potenciais sobre as abordagens convencionais, incluindo; considerável economia de água, maior produtividade de etanol, redução de custos associados com o tratamento do efluente (vinhaça), bem como uma considerável economia de energia na etapa de destilação, menor custo de capital e também minimização na contaminação bacteriana. Esta tecnologia proporciona um aumento da produção sem grandes investimentos e alterações nas instalações existentes e têm sido amplamente adotada para a produção de etanol (WANG et al., 2007).

No entanto, o uso da tecnologia VHG impõe condições estressantes às células de levedura, que têm sido associadas com a perda de viabilidade durante a fermentação VHG, taxas de fermentação reduzidas e fermentações incompletas. Assim, a implementação bem sucedida da tecnologia VHG na produção de etanol requer o desenvolvimento de cepas de levedura que fermentem eficientemente altas concentrações de açúcar ( $> 250$  g/L). Essas cepas devem ser resistentes às múltiplas tensões encontradas no processo, incluindo o estresse osmótico que resulta das altas concentrações de açúcar, o estresse de etanol no final da fermentação, as condições anaeróbicas estabelecidas nos reatores de larga escala e os procedimentos de reciclagem celular para utilização da biomassa de levedura durante vários ciclos consecutivos de fermentação. Entretanto, a fermentação em VHG tem um grande potencial para a produção de etanol, aumentando tanto a taxa de fermentação quanto a concentração final de etanol e reduzindo os custos do processo, desde que as consequências negativas relacionadas às diferentes situações de estresse geradas durante o processo fermentativo sejam eliminadas, a fermentação em VHG se torna possível (BAI et al., 2008; PIDDOCKE et al., 2009; MUSSATTO et al., 2010).

A maior limitação da aplicação imediata da tecnologia VHG são as leveduras industriais disponíveis, que perdem a capacidade fermentativa e viabilidade em altas concentrações de açúcar. Atualmente, as fermentações ocorrem com mostos contendo de 18 a 25% de açúcar e o etanol produzido acumula em média de 11 a 12% (DIAS et al., 2015).

Outra variável relevante no processo produtivo brasileiro são os reciclos, isto é, a utilização em cada ciclo fermentativo sequencial da biomassa do ciclo anterior como inóculo. Este processo repete-se por muitas vezes, portanto, as leveduras são utilizadas durante

diversos ciclos fermentativos intercalados por lavagem ácida (pH 2) para desinfecção bacteriana. Todos estes fatores provocam redução de viabilidade celular e da taxa de propagação e, por consequência, redução do rendimento fermentativo (BASSO e PAULILLO, 2003).

## 2.4 FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO

Existem muitos fatores que influenciam o desempenho do processo de fermentação alcoólica, tais como: temperatura, aeração, pH, aditivos químicos, tais como ácidos, biocidas, antibióticos, sais e nutrientes; contaminação microbiana, inibição por alguns componentes, agindo de forma direta, ou indiretamente sobre as propriedades da levedura. Alguns desses fatores que influenciam a eficiência da produção de etanol serão discutidos a seguir.

A produção de etanol usando a tecnologia VHG pode ser melhorada, aumentando assim o rendimento percentual de etanol, com a aplicação de estratégias, tais como: alimentação com vitaminas, alimentação de nutrientes, suplementação do meio de cultura, otimização da temperatura e taxa de aeração.

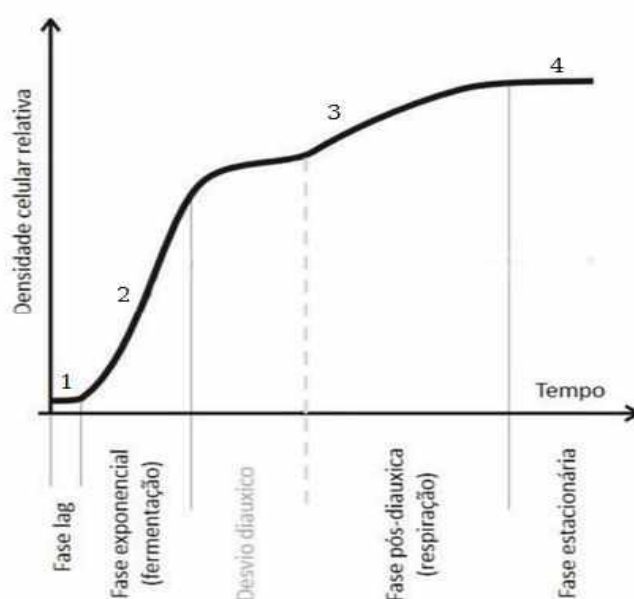
### 2.4.1 Meio de cultura

As leveduras são compostas principalmente de C, H, O, N, S e P presentes em macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios) juntos com íons inorgânicos ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ , entre outros) e elementos traço, necessários em pequenas quantidades, e que desempenham papel estrutural e funcional no metabolismo celular. Esses microrganismos também necessitam de fatores de crescimento como vitaminas, purinas e pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e esteróis. Quando uma espécie de levedura necessita de um fator de crescimento e não ocorre a adição deste fator ao meio de cultura, ocorre um crescimento pobre e diminuição da velocidade dos processos metabólicos (SILVA, 2010).

Em todos os processos industriais em que se utiliza a levedura *S. cerevisiae* os meios de cultivo devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, uma fonte de carbono, além de sais e vitaminas. Por esse motivo, os principais nutrientes utilizados pelas leveduras, quanto à quantidade, são o carbono e nitrogênio. Isso implica que os fluxos de carbono e nitrogênio tanto quanto suas interações constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular (HORAK, 1997). As coordenações dos fluxos de carbono e nitrogênio podem ser reguladas na assimilação ou no metabolismo, dependendo das condições de

crescimento e da natureza da fonte de carbono e nitrogênio (TER SCHURE et al., 1995; SHINEPER et al., 2004).

A composição do meio de cultura constitui um dos vários fatores que se torna necessário controlar quando se trabalha com *S. cerevisiae*, uma vez que a fonte de carbono disponível poderá induzir alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas relevantes para a sua sobrevivência. Quando inoculada em meio de cultura que contenha uma fonte de carbono fermentável, como a glicose, a *S. cerevisiae* apresenta quatro fases distintas de crescimento (Figura 2.5).



**Figura 2.5** – Curva de crescimento celular para *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: PIRES, 2017 - Adaptado).

A fase lag (1) é o período de adaptação da levedura ao novo meio, em que ocorre pouca ou ausência de divisão celular, estado de latência, com taxa respiratória lenta que termina quando as células iniciam a fase seguinte. A fase log ou exponencial (2) é o momento em que as células iniciam seu processo de divisão entrando no período de crescimento ou aumento logarítmico, as células crescem rapidamente e a sua massa aumenta exponencialmente. Nesta fase, onde a taxa de morte pode ser considerada vestigial relativamente à sobrevivência celular, as necessidades energéticas das células são majoritariamente supridas via metabolismo fermentativo, ocorrendo a acumulação de etanol (BRAUER et al., 2005).

O conteúdo celular da trealose aumenta durante o crescimento exponencial em resposta a mudanças de temperatura atingindo um valor máximo na fase estacionária, o qual

leva a aquisição da tolerância ou resistência ao calor, ao estresse osmótico e etanólico (ELEUTHERIO et al., 1995).

A terceira fase do crescimento, pós-diáuxica (3), tem o seu início quando as células esgotam a maior parte da fonte de carbono fermentável, observando-se então grandes alterações fisiológicas e morfológicas. Nesta fase, a expressão das enzimas fermentativas encontra-se bloqueada e as células passam a utilizar a respiração como principal via de síntese de ATP, utilizando os produtos da fermentação, majoritariamente etanol e glicerol, como fontes de carbono. A última fase é a estacionária (4) quando os nutrientes se esgotam, cessando a divisão celular e ocorrendo um abrandamento do metabolismo. A respiração torna-se então vital para a sua sobrevivência (PIRES, 2017).

A capacidade das cepas de levedura em atingir um alto nível de etanol depende fortemente das condições nutricionais e das funções de proteção que alguns nutrientes podem proporcionar. O nitrogênio assimilável é o componente mais importante no meio de fermentação e foi relatado como sendo um nutriente limitante na fermentação de etanol VHG (BAI et al., 2008).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, foram relatados elementos-traço como zinco (Zn), magnésio (Mg) e manganês (Mn) para promover a taxa de conversão de açúcar e são necessários para várias vias metabólicas como co-fatores, resultando em maior tolerância ao etanol particularmente, sob fermentação VHG (WANG et al., 2007; PALUKURTY et al., 2008; XUE et al., 2008; PEREIRA et al., 2010).

O zinco é um elemento essencial para o crescimento normal, metabolismo e fisiologia da célula de levedura, além de atuar como um co-fator para muitas proteínas, principalmente do grupo “zinc-finger” (ZHAO e BAI, 2012). Zhao e Bai (2009) utilizou a suplementação do meio com diferentes concentrações de zinco para estudar seu efeito na tolerância celular ao etanol e na produção de autofloculação por células de *S. cerevisiae*. Em todas estas dosagens houve incremento da resistência a alta temperatura e a alta concentração de etanol, com aumento do conteúdo de ergosterol na membrana celular e de trealose no interior das células. A adição de sulfato de zinco de 50 ppm, elevou a produção de etanol em 9,6% em relação ao meio controle, sem zinco. A produção de glicerol foi reduzida com a suplementação de sulfato de zinco, com o menor nível em 3,21 g/L. Em todos os ensaios o autor observou estreita relação entre a viabilidade celular e o zinco suplementado, resultando em maior produção e tolerância a etanol.

O ferro e o cobre são particularmente importantes, pois participam das reações que necessitam a transferência de elétrons, havendo profundo efeito do crescimento e metabolismo celular, todavia sua concentração pode ser letal a célula, quando estes dois elementos deixam de ser essenciais para tóxicos, em concentrações excessivas (FREITAS et al., 2003).

O cádmio em concentrações entre 0,05 e 0,5mM é tóxico às células de *Saccharomyces*, como a linhagem industrial PE-2 (SILVA e BASSO, 2004). Todavia esta toxicidade depende das características químicas do meio, pH e concentração da fonte de carbono (SILVA et al., 2009).

O cálcio e o magnésio presente no caldo estão relacionados com a capacidade de tolerância ao estresse causado pela desidratação e hidratação (TROFIMOVA et al., 2010), sendo importante para a estabilização das membranas das células de leveduras além de serem íons protetores em altas concentrações de etanol, principalmente quando submetidas a grandes variações do meio, como a pressão osmótica (COURCHESNE et al., 2011).

Estes nutrientes são de fundamental importância em processos industriais que centrifugam a biomassa celular, havendo assim a perda de umidade. Os íons de fósforo e magnésio acumulados nas células de leveduras são importantes para a fermentação alcoólica (VILLEN et al., 2009).

Para obter alta eficiência de produção de etanol por levedura, muitos fatores, como nitrogênio, oligoelementos, vitaminas e aeração foram investigados. O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais para a fermentação do etanol, especialmente sob condições de VHG (BAI et al., 2008). Promove o crescimento das leveduras, o aumento da taxa de produção de etanol e a tolerância ao etanol (BAFRNCOVA et al., 1999). O extrato de levedura é amplamente utilizado em estudos em escala laboratorial como fonte de nitrogênio para o crescimento de leveduras e suplemento nutricional em fermentação alcoólica (LAOPAIBOON et al., 2009; KHONGSAY et al., 2012). No entanto, o extrato de levedura não é apropriado para a produção industrial de etanol devido ao seu alto custo. Assim, é importante explorar fontes de nitrogênio de baixo custo para fornecer requisitos nutricionais para a fermentação e crescimento das leveduras. Vários autores investigaram continuamente fontes de nitrogênio de baixo custo para a melhoria do crescimento de leveduras, taxa de consumo de açúcares e produção de etanol sob fermentação VHG, tais como farinha de milheto (REDEY e REDDY, 2005, 2006), água de maceração de milho (PEREIRA et al., 2010), levedura fresca (JONES e INGLEDEW, 1994) e

subproduto da cervejaria e muitos oligoelementos essenciais (SRIDEE et al., 2011; DEESUTH et al., 2015).

#### 2.4.2 Temperatura

A temperatura é um parâmetro operacional crucial devido à sua influência na conversão de açúcares em etanol. A produção industrial de etanol depende da atividade microbiana, particularmente da levedura. Neste processo, as vantagens em alta temperatura incluem a economia de energia obtida através da redução nos custos de resfriamento ou evitando a interrupção frequente da produção devido a problemas de superaquecimento, normalmente encontrados em áreas/estações de altas temperaturas ambientes onde o resfriamento não está disponível. Outra vantagem da utilização de temperaturas mais altas inclui risco reduzido da possibilidade de contaminação (SREE et al., 2000).

Embora a alta temperatura seja desejável na indústria de fermentação alcoólica devido ao potencial de economia nos custos de resfriamento, o impacto negativo da alta temperatura, que acarreta no término prematuro e no desempenho da fermentação alcoólica, é muito pior sob as condições VHG do que a fermentação regular. Jones e Ingledew (1994) investigaram o impacto da temperatura na fermentação VHG e descobriram que o tempo de fermentação foi drasticamente estendido, passando de 80 para 260 horas quando a temperatura passou de 33 para 17 °C.

As temperaturas ótimas de crescimento de *S. cerevisiae* variam de 25 a 35 °C. No entanto, o estresse térmico, bem como outros estresses, como exposição a alta concentração de etanol e pressão osmótica, gerados durante o processo de fermentação, afetam significativamente a produção de etanol, diminuem a taxa específica de crescimento das leveduras e eficiência do processo rapidamente, devido ao aumento de morte celular (PATRASCU et al., 2009).

Para a fermentação VHG, uma análise quantitativa do efeito da temperatura no consumo de substrato e nas taxas de produção de etanol deve ser investigada para definir as condições de operação mais adequadas usando a definição de perfis ótimos de temperatura. O efeito da temperatura na produção de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar por *S. cerevisiae*, evidencia que a taxa de crescimento específica máxima aumenta à medida que a temperatura aumenta. Após aproximadamente 37 °C, a taxa de crescimento específico máxima começa a diminuir. As concentrações máximas de etanol e células, isto é, as concentrações nas quais o crescimento celular cessa, estão inversamente relacionadas com a

temperatura de fermentação. Este modelo foi validado durante a fermentação descontínua sob condições de fermentação convencionais (RIVERA et al., 2006).

Segundo Lalue et al. (2009), quando aumenta-se a concentração de açúcar, deve-se diminuir a temperatura, a fim de evitar quedas na viabilidade devido ao aumento da quantidade de etanol produzido pelas células de levedura. Assim, é recomendado diminuir a temperatura para minimizar a mortalidade celular e manter níveis elevados da produção de etanol, quando a temperatura está aumentando no reator industrial.

Os resultados dos perfis fermentativos em mosto a base de caldo de cana-de-açúcar ajustado para a concentração de 30% de sacarose (m/v) a 30°C obtidos por Barbosa (2013), mostrou ser menos agressivo do que os perfis fermentativos a 37°C, indicando que a temperatura exerce efeito no processo fermentativo, induzindo a perda da viabilidade celular, com efeito sobre vitalidade fermentativa, e na redução da produção de etanol.

Cruz et al. (2018), avaliando a influência conjunta das variáveis temperatura, concentrações celular e de sacarose iniciais na fermentação, obtiveram melhores resultados com rendimento de 93% e teor final de etanol de 14,4°GL à 26 °C, utilizando concentração celular de 35 g/L e sacarose inicial de 240 g/L.

### 2.4.3 pH e aeração

A permeabilidade de alguns nutrientes essenciais nas células é influenciada pela concentração de  $H^+$  no caldo de fermentação (ZABED et al., 2014). Mudanças no pH operacional no processo de produção de etanol VHG podem induzir uma mudança na principal via de fermentação, além do pH do caldo influenciar na contaminação bacteriana, no crescimento das leveduras, na taxa de fermentação e na formação de subprodutos. Assim, é importante controlar o valor do pH na faixa de 4,0 e 5,0. Além dessa faixa, pode ocorrer desvio de parte do substrato para a formação de subprodutos, como ácido acético e ácido butírico, reduzindo a eficiência da fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001).

Os valores de pH dos mostos industriais, geralmente, encontram-se na faixa de 4,5 a 5,5 mas, as leveduras mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido. O tratamento ácido também provoca lixiviação de nutrientes tais como, N, P e K da levedura que acaba por elevar o pH. Embora o tratamento ácido se mostre estressante à levedura, ainda apresenta efeito benéfico de controlar a contaminação bacteriana, pois ocorre a redução significativa no número de bactérias (LIMA et al., 2001).

O ácido sulfúrico é um ácido mineral forte utilizado para o controle de pH nas cubas, além de ser um bactericida. Um pH baixo (ácido) restringe o crescimento da levedura e mantém sua viabilidade em torno de 90%, além de restringir a proliferação de bactérias. Um pH alto (alcalino) acelera o brotamento da levedura e proliferação de bactérias. O valor de pH utilizado industrialmente no inóculo da fermentação alcoólica utilizando caldo-de-cana é de 2,5 (CANDIDO, 2012).

Foi relatado que a levedura *S. cerevisiae* pode produzir etanol a partir de caldos, mesmo em pH 3,8 (LOUHICHI et al., 2013), embora o pH crítico para este organismo seja 2,3 (KASEMETS et al., 2007). Por outro lado, a maior produção teórica de etanol (92,75%) foi obtida usando *Z. mobilis* ajustando a faixa de pH do caldo entre 5,0 e 6,0 (ONSOY et al., 2007). Uma variação ideal de pH também foi relatada para várias matérias-primas, como 2,8 a 3,4 (FUKUSHIMA e YAMADE, 1988) para o caldo-de-cana e 4,0 a 4,5 para a sacarose (ISONO e HOSHINO, 2000).

Cruz et al. (2018), compararam o efeito do pH do inóculo no desempenho da fermentação, utilizando caldo-de-cana e pH de 2,5 e 4,5. Os resultados obtidos com o pH 4,5 foram inferiores à aqueles obtidos na fermentação realizada ajustando-se o pH do inóculo para 2,5. 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.

Comumente, o etanol é produzido através da via da glicólise sob condições anaeróbicas. No entanto, verificou-se que a aeração apropriada associada à agitação, especialmente no início do crescimento da levedura, pode melhorar significativamente o consumo de açúcar e produção de etanol, principalmente sob condições VHG (ALFENORE et al., 2004; PATRASCU et al., 2009; KHONGSAY et al., 2012).

O efeito de Crabtree descreve o fenômeno pelo qual o crescimento respiratório de alguns tipos de leveduras, como a *S. cerevisiae*, é inibido ou reprimido pela presença de hexoses, em particular a glicose. O efeito de Crabtree manifesta-se sempre que *S. cerevisiae* se encontra em condições totalmente aeróbias e utiliza glicose como fonte de carbono. Este fenômeno, que depende da concentração de glicose no meio de cultura, determina o tipo de vias metabólicas que a célula adota para obter o ATP que sustenta o seu crescimento e sobrevivência. Em geral ocorre uma predominância da via fermentativa que inclui a glicólise e a fermentação alcoólica/lática sobre a via respiratória (PIRES, 2017).

A quantidade de aeração necessária é dependente de vários fatores, como por exemplo o tipo de levedura utilizada, disponibilidade de nutrientes e processos de fermentação (PIRES, 2017). Verificou-se que *S. cerevisiae* exigia um certo suprimento de oxigênio elementar para sintetizar ergosterol e os ácidos graxos insaturados, que são essenciais para a integridade da membrana plasmática (YOU et al., 2003).

Lin et al. (2011) relataram que uma pequena quantidade de aeração durante o estágio inicial de crescimento das leveduras resultou no aumento da eficiência da produção de etanol.

Deesuth et al. (2015), estudaram o efeito combinado da suplementação de nutrientes e aeração na fermentação VHG sob diferentes taxas de aeração e concluíram que a produção de etanol sob condições VHG na menor taxa de aeração estudada (0,05 vvm), levou a um aumento no valor final de etanol (131,6 g/l) com 72 horas de fermentação. Estes resultados indicaram que a aeração em níveis apropriados poderia melhorar a eficiência da produção de etanol em condições VHG, além disso, a formação de subprodutos foi reduzida em 25%.

Arshad et al. (2017), estudaram a tecnologia de fermentação VHG em experimentos em batelada alimentada, realizados em fermentadores a uma temperatura de 32°C com a linhagem mutante de *S. cerevisiae* UAF-1 e o pH foi ajustado para 4,0-4,5. O efeito de diferentes °Brix (32, 36 e 40) e vazões de ar (0,00, 0,20, 0,40 e 0,60 vvm) foram estudados na produção de etanol. A 32 °Brix, a produção de etanol foi de 8,9% (v/v), com concentração de açúcar residual de 35,41 g/L, sem aeração. A produção de etanol foi registrada em 9,3% (v/v) a 36 °Brix sem aeração e alcançou 11,3% (v/v) com aeração. As taxas de aeração de 0,20, 0,40 e 0,60 vvm aumentaram a produção de etanol em 20%, 16% e 14% em relação à fermentação não aerada, respectivamente. A produção máxima de etanol de 12,2% (v/v) foi registrada em 40° Brix com taxa de aeração de 0,2vvm. Os níveis de açúcares residuais foram 18,7, 24,8 e 21,2 g/L a 0,2, 0,4 e 0,6 vvm, respectivamente, enquanto que na fermentação não aerada, o açúcar residual foi registrado em 60,4 g/L, indicando que a aeração juntamente com o nível de °Brix também é um fator importante na produção de etanol. O consumo de água e vapor reduziu significativamente sob condições ótimas de °Brix e taxa de aeração. Os resultados revelaram que a fermentação VHG com fluxo contínuo de ar é uma técnica viável para reduzir o custo de produção de etanol a partir do melaço em escala industrial.

#### **2.4.4 Concentração de inibidores e estresses**

As leveduras, durante a fermentação alcoólica, podem estar submetidas a uma variedade de parâmetros físicos, químicos ou biológicos que são referidos como 'estresse'

(Figura 2.6). No entanto, as células de levedura têm mecanismos de resposta ao estresse para as condições industriais de fermentação e tratamento com ácido (REIS et al., 2013).



**Figura 2.6** – Fatores estressantes que afetam as células de levedura na produção de etanol e mecanismos comuns de defesa celular (Fonte: LOPES et al., 2016 - Adaptado).

O etanol é um dos principais fatores de estresse que atuam sobre a levedura. O acúmulo de etanol no meio de fermentação, em última análise, inibe o crescimento e a viabilidade dos microrganismos produtores de etanol, causando um efeito tóxico na levedura (STANLEY et al., 2010). Segundo Alves (1996), o etanol foi o primeiro fator a ser reconhecido como um inibidor da fermentação alcoólica. Os fatores que mais influenciam na sensibilidade do microrganismo ao etanol são: a temperatura, a aeração e a composição do meio, agindo direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática, provocando modificações na membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e ação de algumas enzimas (ATALA, 2004).

Quando o estresse térmico ocorre, a sensibilidade de *S. cerevisiae* ao etanol aumenta, levando ao término prematuro da fermentação (VAN UDEN, 1989). A elevação dos níveis de etanol durante a fermentação de substratos ricos em açúcar por *S. cerevisiae* em batelada alimentada causa redução na taxa específica de crescimento, na taxa de fermentação e na viabilidade celular da levedura (CASEY e INGLEDEW, 1986). No caso de cepas industriais de *S. cerevisiae* o mais importante estresse químico é a toxicidade do etanol, sendo assim, de

grande significado comercial a habilidade ou inabilidade das leveduras em tolerar os efeitos tóxicos do etanol (BIRCH et al., 2003).

Os efeitos tóxicos do etanol podem ser verificados na inibição das enzimas glicolíticas e em numerosos processos biológicos, muitos dos quais estão associados com os lipídios da membrana celular (PETROV e OKOROKOV, 1990). Muitas das mudanças induzidas em leveduras pela exposição a níveis estressantes de etanol são idênticas às aquelas causadas pelo estresse térmico (PIPER et al., 1994).

A concentração inicial de substrato também exerce forte influência sobre a taxa específica de crescimento microbiano. A concentração inicial de açúcar para as destilarias está em uma faixa de 15 a 22 % (m/m) de açúcares. Elevadas concentrações de substrato resultam em maior pressão osmótica dentro da célula e, por conseguinte, resultando no aumento de morte celular, limitando o crescimento microbiano (PATERNINA, 2011).

Altas concentrações de açúcar no início, e altos níveis de etanol no final da fermentação, expõem as leveduras a estresses fisiológicos, e para isso é necessário a utilização de linhagens robustas, que mantenham a viabilidade celular e vitalidade fermentativa durante os ciclos fermentativos. Além do estresse osmótico e etanólico, as leveduras são submetidas a outros tipos de estresses, incluindo lavagens com ácido, contaminação com outros microrganismos, ausência de nutrientes no meio e elevada temperatura. Consequentemente o estado fisiológico e a performance fermentativa das leveduras podem se alterar e não permanecer constantes durante os vários ciclos de fermentação (GIBSON et al., 2007; WANG et al., 2007; MIRA et al. 2010; TEIXEIRA et al. 2011).

Variados efeitos estressantes afetam negativamente as leveduras, sendo os mais visíveis a redução da viabilidade, o aumento da quantidade intracelular de glicerol, e a diminuição da quantidade intracelular do glicogênio e da trealose. Juntamente com a redução da viabilidade ocorre uma redução na produção de biomassa. O glicogênio e a trealose são carboidratos de reserva e estão envolvidos na proteção das células quanto aos estresses ocasionados pelo meio. O glicogênio é fonte de energia em condições de limitação de açúcar (ALVES, 1994), enquanto a trealose está associada tanto à proteção das enzimas glicolíticas contra a desnaturação em situação de estresse, como também em manter a integridade e permeabilidade da membrana plasmática (PANEK, 1990).

Trealose e glicogênio são carboidratos de reserva para energia adicional quando as células estão famintas por açúcares (FERREIRA et al., 1999; PAULILLO et al., 2003). Além disso, a trealose é um composto protetor da membrana que ajuda as células a tolerar a

desidratação e altas concentrações de etanol, bem como outros fatores estressantes industriais (PANEK et al., 1990; D'AMORE et al., 1991).

O meio é um fator determinante para a viabilidade das células de levedura, pois afeta o controle do teor de água, o que é crucial para a integridade celular. As células expostas ao estresse hipertônico perdem água e induzem uma resposta adaptativa para compensar a desidratação e proteger as estruturas celulares. O acúmulo de solutos compatíveis, em particular o glicerol, tem função essencial na aquisição de resistência celular a mudanças na osmolalidade do meio, uma vez que diminui o potencial intracelular da água. Alterações no metabolismo lipídico também podem estar envolvidas na regulação do conteúdo de glicerol, uma vez que mudanças na composição lipídica da membrana plasmática podem afetar a fluidez da membrana e sua permeabilidade à água e ao glicerol. O outro componente cujo conteúdo extra celular aumenta sob condições de estresse osmótico é a trealose. A importância da trealose é evidenciada pela correlação entre os níveis de trealose intracelular e a capacidade de resistir ao estresse osmótico induzido por NaCl ou sorbitol. De fato, cepas mutantes de *S. cerevisiae*, incapazes de produzir trealose, revelaram uma maior sensibilidade a condições de estresse osmótico (HOUNSA et al., 1998; HOHMANN, 2002).

## 2.5 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a forma que o substrato é adicionado e o produto é retirado do fermentador. De acordo com Schmidell e Facciotti (2001), entre as formas de operação de reatores biológicos, tem-se o batelada, batelada alimentada e contínuo. Estas modalidades podem ter recirculação de células ou não.

O reciclo das células visa reduzir o tempo gasto em certas etapas como a preparação de um inóculo. Neste caso, faz-se a separação das células utilizando uma centrífuga e estas são recicladas à dorna de fermentação (SCHMIDELL e FACCIOITI, 2001).

A etapa de fermentação industrial de etanol no Brasil pode ser classificada de duas formas principais: batelada alimentada com reciclo de células, processo conhecido como Melle-Boinot e o processo de fermentação contínua. Sendo o processo em batelada largamente o mais utilizado hoje, representando mais de 85% das usinas operando em batelada alimentada e um valor inferior a 15% com fermentação contínua multiestágios (FINGUERUT, 2004).

### 2.5.1 Batelada

O processo descontínuo, também conhecido como batelada, é o processo em que o meio fermentativo, conhecido como mosto, é inoculado com microrganismos na dorna de fermentação onde as condições ótimas para o agente da fermentação são mantidas. 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. 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. 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, 2001; SCHIMIDELL e FACCIOITI, 2001).

Segundo Tosetto (2002), podem ser utilizados dois sistemas para o processo em batelada. O sistema de cortes que consiste depois da primeira fermentação dividir em dois o volume do mosto, enviando a metade para a destilação e o resto utilizar como pé-de-cuba para a próxima fermentação; e o sistema de cultura pura ou pé-de-cuba, onde se utiliza uma cultura pura para cada fermentação e depois completa o volume do fermentador com o mosto.

### 2.5.2 Batelada alimentada

O processo batelada alimentada é amplamente empregado na produção industrial devido à compilação dos benefícios dos processos batelada e contínuo. Os processos de fermentação por batelada alimentada é o mais utilizado nas destilarias, seguido das fermentações em contínuo. Apesar de maiores investimentos para instalação, o processo batelada alimentada apresenta melhores resultados quando comparado ao processo de fermentação contínua. Um estudo realizado durante oito anos consecutivos com 62 destilarias (51 processo batelada alimentada e 11 processo contínuo) mostrou que os processos batelada alimentada alcançaram os maiores rendimentos de fermentação. Além disso, observaram uma menor contaminação bacteriana no vinho e menor consumo de produtos químicos como ácido sulfúrico e antibióticos em comparação com processos contínuos (GODOY et al., 2008).

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

intermitente (CARVALHO e SATO, 2001). Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO e SATO, 2001).

Fermentações em batelada alimentada com alimentação contínua foi estudada por Phukoetphim et al. (2017), e parâmetros como a suplementação de nitrogênio, tempo de alimentação e taxa de alimentação foram variáveis essenciais para melhorar a eficiência da produção de etanol sob condições VHG. Neste estudo, a alimentação contínua a partir de 9 horas com uma taxa de alimentação de 40 g de açúcar por hora proporcionou a maior eficiência de produção de etanol.

### 2.5.3 Contínuo

O processo de fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão, mantendo-se o volume de reação constante através da retirada contínua de caldo fermentado. Admite-se que cada porção de meio alimentada no fermentador seja instantaneamente misturada com o volume de reação, de forma que o líquido efluente possuirá as mesmas concentrações de células, substrato e produto, que aquelas existentes no meio de reação (GOMEZ, 2011).

Nesse tipo de processo, é essencial manter um volume de cultura constante. O produto, o qual é retirado do reator, contém etanol, células e açúcar residual. A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário, condição na qual as variáveis de estado (concentração de célula, de substrato e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema (SOUZA, 2009).

Guerreiro (1995) destacou os benefícios da fermentação contínua. O emprego da fermentação contínua associada à adoção de técnicas como cinética microbiana, otimização, simulação de processos e projetos específicos pode trazer vantagens como: modernização da usina; aumento na produção; redução da fermentação em estado estacionário; redução de consumo de insumos; uniformidade do produto; maior controle operacional do processo.

Andrade (2000), também cita outras vantagens como: redução de tempos não produtivos (carga, descarga, limpeza) em cada ciclo do processo conduzido a um aumento da

produção total; não necessita de unidades de armazenamento intermediário; a automação é simplificada, podendo-se basear em uma amostragem em tempo real.

## 2.6 CONFIGURAÇÕES DE REATORES

Reatores, também chamados de fermentadores (apesar de existirem tipos que trabalham outros processos além da fermentação), são tanques fechados onde se controlam as condições adequadas para um processo biológico ocorrer da melhor forma possível, sendo elas, na maioria dos casos, temperatura, agitação, aeração (quantidade de oxigênio que entra no sistema) e pH. Diante dos diversos modelos existentes de reatores, os mais comumente empregados em cultivos de microrganismos e células, são os reatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e os reatores não-convencionais pneumáticos, tipo “coluna de bolhas” e tipo “air-lift” (CERRI, 2005).

### 2.6.1 Reator de tanque agitado (STR)

O reator de tanque agitado (Stirred Tank Reactor – STR) é um tipo de reator muito simples e o mais amplamente utilizado. Consiste em um cilindro com agitação mecânica no qual são comuns relações de diâmetro-altura de 2:1 ou 3:1, que pode ser usado tanto para células ou enzimas livres, quanto imobilizadas. O agitador desempenha várias funções em simultâneo: auxilia a transferência de massa e de calor e agita e homogeniza as suspensões. Tipicamente, apenas 70-80% do volume do reator é preenchido com meio líquido, para permitir o desprendimento de gases formados durante o processo (DORAN, 1997).

Os reatores agitados mecanicamente são também conhecidos como reatores de mistura completa e, sua capacidade é bastante variável e depende do tipo de processo no qual esta sendo empregado (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Estes reatores apresentam vantagens importantes quando aplicados à escala industrial; além de serem o tipo de reator mais estudado e, por isso, sobre o qual existe mais informação disponível, permitem um controle muito fácil da dispersão de gás e da agitação do meio por simples alteração da velocidade do agitador, que é responsável por uma dispersão de gás eficiente e pela possibilidade de empregar este tipo de reator em fermentações com meios muito viscosos. Como a regulação da vazão de arejamento é feita essencialmente em função das necessidades de oxigênio (e não tanto para auxiliar a agitação ou para induzir a circulação do meio, como é o caso de outros reatores), é possível trabalhar com vazões de arejamento reduzidas (TEIXEIRA et al., 2007).

Apesar das vantagens mencionadas, este tipo de reator apresenta uma baixa eficiência de transferência de oxigênio e necessita de grande potência de agitação que, por sua vez, gera grandes quantidades de calor cuja remoção do sistema pode ser problemática. Além disso, o tipo de agitação cria no meio tensões de corte elevadas, o que torna estes reatores inapropriados para a cultura de células ou agregados sensíveis a esse tipo de forças. Por último, os custos de construção e manutenção do equipamento são elevados, especialmente devido às selagens mecânicas que o compõem e à já referida grande potência de agitação de que necessitam (TEIXEIRA et al., 2007).

### **2.6.2 Reator Air-lift**

Os reatores air-lift (ARL) são aqueles que melhor conferem homogeneidade de nutrientes ao sistema, ganhando assim destaque em processos biotecnológicos, frente ao modelo convencional tipo tanque agitado e aerado, além de proporcionarem altas transferências de oxigênio (CHISTI, 1989).

O reator air-lift é empregado em bioprocessos aeróbios sendo um reator que não apresenta partes móveis, e a dispersão gás-líquido é realizada pelo ar de entrada do aspensor (ONKEN e WEILAND, 1983).

O meio de cultura é deslocado no sentido ascendente impulsionado pelo deslocamento de bolhas de ar que são alimentadas pelo aspensor localizado ao fundo do vaso, retomando no sentido descendente por uma região distinta da região de subida. As regiões dos reatores air-lifts consistem em uma região aspergida por gás, denominada de região de subida (“riser”) e uma região de descida (“downcomer”) por onde retoma o meio reacional. A região de subida e de descida são interligadas no topo e na base do reator (CHISTI e MOO-YOUNG, 1987).

A velocidade de circulação neste tipo de reator está diretamente dependente da vazão de arejamento. Na seção superior, zona de desgaseificação, a ação conjunta do fluxo do líquido aliado à liberação do gás provoca uma mistura muito eficaz, esta parte do reator se comporta como um tanque perfeitamente agitado. Estas características dotam o air-lift de boas propriedades de transferência de massa líquido-líquido e líquido-sólido (TEIXEIRA et al., 2007).

O principal objetivo dos reatores air-lifts é facilitar a troca de matéria entre as fases líquidas e gasosa, por exemplo, em processos que envolvam fotossíntese, possibilitando a

dissolução de CO da fase gasosa para a líquida, bem como a remoção de O<sub>2</sub> produzido da fase líquida para a gasosa (MERCHUK e GLUZ, 1999).

Os reatores air-lift são conhecidos, tal como as colunas de bolhas, pelo baixo valor das tensões de corte associadas ao fluxo da fase fluida, pelo que são adequados para processos envolvendo microrganismos imobilizados (TEIXEIRA et al., 2007).

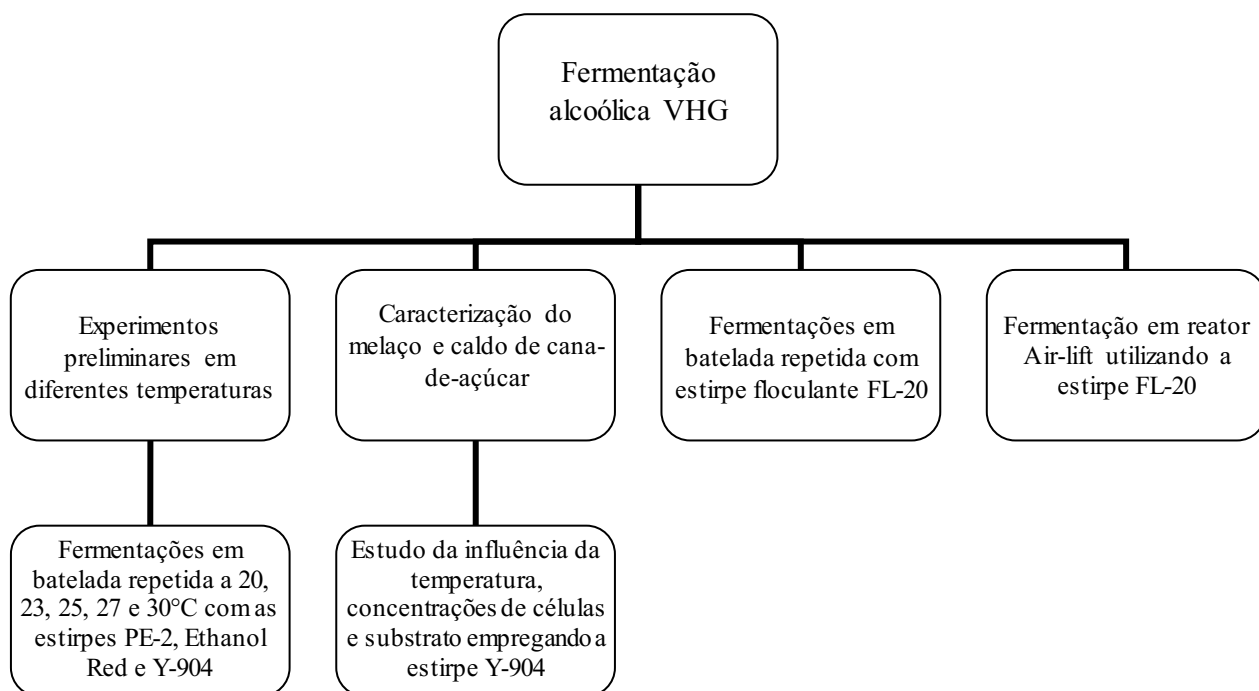
---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

---

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados no desenvolvimento experimental desta Tese, 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 MATERIAL

#### 3.1.1 Locais de execução da pesquisa

A pesquisa foi realizada na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia - FEQ/ UFU e no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho - CEB/UM em Portugal.

#### 3.1.2 Microrganismos

Utilizou-se quatro diferentes estirpes da levedura *S. cerevisiae* na realização deste trabalho. As cepas industriais Y-904 na forma granulada produzida pela AB Brasil e Ethanol Red produzida pela Fermentis do grupo Lesaffre, *S. cerevisiae* PE-2 (BASSO et al., 2008) e a

estirpe recombinante FL-20, desenvolvida no Centro de Engenharia Biológica (CEB) na Universidade do Minho em Braga-PT (GOMES et al., 2012).

### **3.1.3 Meios de cultura**

#### **3.1.3.1 Meio de cultura do inóculo**

A levedura para inoculação foi cultivada em frascos erlenmeyer, com meio contendo 50 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura. O meio para a estirpe recombinante FL-20 também incluiu 1,5 mM de  $\text{CuSO}_4$ . Após incubação da levedura a 30 °C e 150 rpm por 24 horas, a suspensão de células foi assepticamente colhida por centrifugação (10 min a 5000 rpm, 4°C) e as células foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) para 200 mg levedura fresca (FY)/mL. Esta suspensão celular concentrada foi misturada com um volume de meio de cultura adequado para atingir uma densidade celular de cerca de  $1,3 \times 10^8$  células/mL.

#### **3.1.3.2 Meio de fermentação**

As fermentações VHG em frascos agitados foram realizadas utilizando um meio previamente otimizado (Pereira et al., 2010), consistindo de 300 g/L de glicose, 44,3 g/L de água de maceração de milho (AMM), 2,3 g/L de ureia, 3,8 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,03 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (correspondendo a 0,12 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ ). A AMM foi cedida pela empresa Companhia Portuguesa de Amidos - COPAM (Portugal) e seu manuseio e composição principal foi previamente relatada (Pereira et al., 2010). O pH do meio foi ajustado para 4,5 com NaOH 1M. O meio foi arejado por agitação com uma barra magnética a 850 rpm durante 20 minutos antes da inoculação.

Para as fermentações em reator de bancada foram utilizados caldo e melaço de cana-de-açúcar cedidos pela empresa British Petroleum - BP (Brasil).

## **3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 Fermentações em bateladas repetidas**

Nesta etapa teve-se como objetivo geral avaliar o desempenho de cepas de levedura com relação à sua reutilização em diferentes ciclos de fermentação.

As fermentações foram realizadas em frascos agitados de volume 100 mL, preenchidos a 40% do seu volume com meio e inóculo. Os frascos eram munidos de rolhas de

borracha perfuradas e dotadas de dois eppendorfs, um interno, para receber refluxo de glicerol e um externo preenchido com glicerol, que possui afinidade com o etanol não permitindo que o etanol evaporado seja expulso do sistema, além de evitar a entrada de ar e permitir a exaustão de CO<sub>2</sub>. As culturas foram incubadas em shaker rotativo nas temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C e agitação orbital de 150 rpm (Figura 3.2), empregando o meio definido em 3.1.3.2. O progresso da fermentação foi acompanhado por perda de massa (resultante da produção de CO<sub>2</sub>) fazendo a pesagem dos frascos a cada hora e comparando com seu peso inicial. Através da estequiometria da reação, cada mol de açúcar redutor é convertido em dois mol de etanol e a dois mol de gás carbônico. Como a massa molecular do etanol (46,068 g) é muito próxima da massa atômica do gás carbônico (44,009g), foi possível estimar a perda de massa (produção de CO<sub>2</sub>) que será aproximadamente igual a produção de etanol, e prever o término da fermentação quando os pesos dos frascos se manterem constantes.



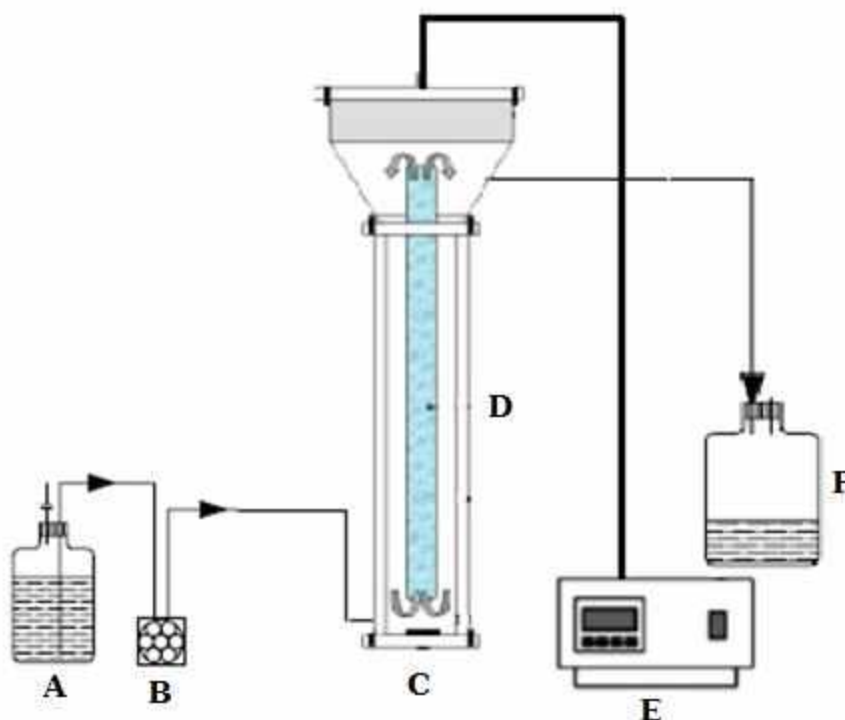
**Figura 3.2** – Fermentação em frascos agitados.

Nos ciclos fermentativos realizados, a primeira fermentação era iniciada com a inoculação de 11 mg de levedura fresca por mL de meio de cultura, o que corresponde a 440 mg de levedura fresca em 40 mL de meio (dessa forma a concentração celular inicial do meio era aproximadamente  $1,3 \times 10^8$  células/mL). No final do primeiro ciclo de fermentação, as

células de levedura floculante (FL-20) foram deixadas a sedimentar em um tubo de 50 mL durante 10 minutos. Para as leveduras não floculantes (PE-2, Y-904 e Ethanol Red), a suspensão de células foi obtida por centrifugação (10 min a 5000 rpm, 4 °C). Ao decantado (ou centrifugado) foi adicionado meio fresco arejado em volume suficiente para atingir 40 mL de meio fermentativo para um novo ciclo de fermentação. Este procedimento para reciclagem de biomassa foi repetido nos ciclos seguintes. Amostras para análises de viabilidade e dosagem de açúcares e etanol foram retiradas no início e no final da fermentação. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3.2.2 Fermentação VHG em reator Air-lift com FL-20

A fermentação foi realizada em um reator tubular de bancada, do tipo air-lift, (com recirculação interna através de um tubo de sucção concêntrico com uma zona de degaseificação aumentada) com capacidade para 3,5 L. O reator foi equipado com uma manta de resfriamento para controle de temperatura, na qual se manteve constante em  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  ao longo do ensaio. O esquema está ilustrado na Figura 3.3.



**Figura 3.3** – Representação esquemática da unidade de trabalho (A) Meio de alimentação, (B) Bomba peristáltica, (C) Entrada de ar, (D) Ponto de amostragem, (E) Controle de temperatura e pH, (F) Saída de meio fermentado.

O microrganismo utilizado no ensaio foi a estirpe recombinante FL-20.

A alimentação do meio fermentativo foi feita por meio de bomba peristáltica (A-B). O meio fermentativo foi alimentado pela parte lateral inferior do reator, com uma vazão de 105 mL/h e taxa de diluição de 0,03 h<sup>-1</sup>. A concentração do meio de alimentação foi de 300 g/L. A cepa utilizada neste experimento foi a FL-20 de característica floculante. A agitação foi fornecida pelo ar estéril que entra na base do reator com vazão específica de 0,1 vvm (C). Amostras eram retiradas frequentemente para análise de açúcar e etanol (D). O pH da fermentação foi controlado e ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio (E). O volume reacional era mantido constante pela retirada contínua de meio fermentado (F).

### 3.2.3 Estudo da influência conjunta da temperatura, concentrações de substrato e célula

Com base nos experimentos do item 3.2.1, optou-se por continuar o trabalho empregando a cepa Y-904.

Foi planejado um Delineamento Composto Central (DCCR): fatorial completo 2<sup>3</sup>, incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, utilizando-se o software *Statistica 7.0*. O objetivo deste DCCR foi analisar a influência conjunta da temperatura, concentração de substrato (ART) e concentração celular. O alfa de rotabilidade utilizado neste delineamento experimental foi de 1,6818.

Os experimentos foram realizados em um fermentador modelo New Brunswick Multigen, de volume útil 2,0 L, com controles de agitação e de temperatura operado em batelada alimentada, completado até 1,5 L em todos os ensaios de fermentação. O volume de inóculo representava em todas as fermentações 30% do volume útil e o meio de cultura 70%. O meio de cultura empregado nestes experimentos foi composto de melaço da fabricação de açúcar de cana, diluído com caldo-de-cana para atingir as concentrações desejadas para cada ensaio.

Ao iniciar-se a alimentação do reator eram acrescidos 1,05 L de meio com tempos de enchimento de 5 horas e concentração do substrato na alimentação conforme experimentos propostos. A alimentação foi realizada por meio de uma bomba peristáltica (Masterflex®, modelo nº 7553-76). A Figura 3.4 ilustra o reator New Brunswick Multigen operando em batelada alimentada.



**Figura 3.4** – Fermentador New Brunswick Multigen operando em batelada alimentada.

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 (com ácido sulfúrico e/ou hidróxido de sódio), as amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 2 horas. O inóculo, com concentração variável de células, definida pelo delineamento experimental, foi preparado diluindo-se a suspensão de microrganismos obtida na hidratação da levedura liofilizada. Para o preparo do inóculo, efetuava-se a leitura dessa suspensão de leveduras no espectrofotômetro a 650nm, sendo possível então conhecer a concentração de microrganismos na suspensão (Apêndice A).

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 % volume/volume com concentração celular em termos de massa seca (Apêndice B).

Os ensaios experimentais foram realizados de acordo com o delineamento experimental utilizado. As variáveis independentes foram a temperatura, que variou de 21,6 a 28,3°C, a concentração celular inicial de 5,95 a 16 % v/v e a concentração de substrato (ART) que variou de 242,7 a 377,5 g/L. As faixas das variáveis foram escolhidas com base nos resultados obtidos por Cruz et al. (2018) e em experimentos preliminares. Na Tabela 3.1 estão apresentados os valores atribuídos às três variáveis independentes no delineamento experimental, sendo a variável  $X_1$  a temperatura (°C),  $X_2$  a concentração de substrato - ART (g/L) e  $X_3$  a concentração celular no inóculo (% v/v).

**Tabela 3.1** - Matriz do Delineamento Composto Central do efeito da temperatura, concentração celular e concentração de substrato (ART)

Experimentos	Valor real (Valor codificado)		
	Temperatura	Concentração de ART	Concentração celular
	T°C (X <sub>1</sub> )	S <sub>0</sub> g/L (X <sub>2</sub> )	X <sub>0</sub> % v/v (X <sub>3</sub> )
1	23 (-1)	270 (-1)	8 (-1)
2	23 (-1)	270 (-1)	14 (+1)
3	27 (+1)	270 (-1)	8 (-1)
4	27 (+1)	270 (-1)	14 (+1)
5	23 (-1)	350 (+1)	8 (-1)
6	23 (-1)	350 (+1)	14 (+1)
7	27 (+1)	350 (+1)	8 (-1)
8	27 (+1)	350 (+1)	14 (+1)
9	25 (0)	242,7 (-α)	11 (0)
10	25 (0)	377,3 (+α)	11 (0)
11	21,6 (-α)	310 (0)	11 (0)
12	28,3(+α)	310 (0)	11 (0)
13	25 (0)	310 (0)	5,95 (-α)
14	25 (0)	310 (0)	16 (+α)
15 (C)	25 (0)	310 (0)	11 (0)
16 (C)	25 (0)	310 (0)	11 (0)
17 (C)	25 (0)	310 (0)	11 (0)

Os níveis das variáveis estudadas foram adimensionalizados pela Equação 3.1.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[ \frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (3.1)$$

Sendo,

X<sub>n</sub> = valor codificado da variável (n = 1,2...);

X = valor da variável a ser calculada;

X<sub>0</sub> = valor da variável no ponto central;

X<sub>+1</sub> = valor da variável no nível superior;

X<sub>-1</sub> = valor da variável no nível inferior.

As equações de codificação da temperatura ( $X_1$ ), concentração de substrato ( $X_2$ ) e concentração celular ( $X_3$ ) estão apresentadas pelas Equações 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente e foram obtidas utilizando a Equação 3.1.

$$X_1 = \frac{(T_0 - 25)}{2} \quad (3.2)$$

$$X_2 = \frac{(S_0 - 310)}{40} \quad (3.3)$$

$$X_3 = \frac{(S_0 - 11)}{3} \quad (3.4)$$

Após realização dos experimentos relacionados na Tabela 3.1 e análise de todas as respostas envolvidas, foi realizado um experimento de validação dentro das faixas de maximização para rendimento, produtividade e viabilidade e minimização do açúcar residual.

### 3.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

#### 3.3.1 Determinação das concentrações de açúcares e de etanol

O etanol e os açúcares totais (glicose, frutose e sacarose) foram quantificados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). 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 Prominence*, 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  $H_3PO_4$  (0,1%), com fluxo de bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32°C e volume de injeção de 20 µL. Os valores obtidos nos cromatogramas foram calculados com o auxílio de curvas padrão.

#### 3.3.2 Determinação da concentração de leveduras e 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. Com isso tem-se um volume total da câmara de 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µL.

Para a contagem das células, utilizou-se a técnica de coloração de azul de metileno (JONES et al., 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 3.5 (MADIGAN et al., 2004).

$$\text{Células} \left( \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células totais} \times \frac{1}{\text{volume do retículo}} \times \text{diluição}}{\text{n}^{\circ} \text{ de retículos}} \times 100 \quad (3.5)$$

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

### 3.3.3 Caracterização do caldo e melaço de cana-de-açúcar

As concentrações de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio e zinco total presentes no melaço e caldo-de-cana foram determinadas por espectrometria de absorção atômica em chama, empregando o aparelho da marca Shimadzu, modelo AA-7000.

A determinação do fósforo total em solução foi determinado pelo método colorimétrico de acordo com o procedimento descrito em APHA – AWWA – WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 1998. – part 4000 Inorganic nonmetallic constituents, 4500-P Phosphorus.

O Nitrogênio total foi caracterizado utilizando a técnica de combustão catalítica a alta temperatura, empregando o aparelho analisador Total Organic Carbon Analyzer TOC-L CPH/CPN da Shimadzu. \\\

### 3.3.4 Ensaio de floculação

A capacidade de floculação da levedura foi avaliada por um ensaio de floculação, descrito de acordo com a metodologia abaixo, adaptada de Gomes et al., 2012.

Retirou-se 25 mL do meio fermentado em que se desejava avaliar a floculação das células. Centrifugou-se a amostra, descartou-se o sobrenadante e logo em seguida as células de levedura foram lavadas duas vezes com solução desfloculadora de NaCl 15 g/L (pH 3) e recuperadas por centrifugação. Foi adicionado ao volume de células provenientes da última lavagem, solução desfloculadora totalizando um volume de 25 mL adicionados em um cilindro graduado de 25 mL. Então, 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM foi adicionado para induzir a floculação. Agitou-se a solução e amostras de 0,2 mL foram retiradas. Nos primeiros três minutos, retirou-se amostras a cada 1 minuto da mesma posição no cilindro graduado, a partir do quarto minuto as amostras eram retiradas a cada 2 minutos até totalizar o tempo de 10 minutos. Foi aferido a absorbância a 600 nm das amostras. Um ensaio sem  $\text{CaCl}_2$  serviu como controle. Perfis de sedimentação foram obtidos pela plotagem da porcentagem de células de levedura em suspensão para cada ponto de amostragem.

## 3.4 CÁLCULOS RELACIONADOS ÀS FERMENTAÇÕES

### 3.4.1 Rendimento

O rendimento em grama de etanol por grama de açúcar redutor total inicial ( $\text{ART}_i$ ), considerando o rendimento teórico de 0,511  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART}}$  como 100%, foi determinado pela Equação 3.6.

$$Y_{p/s} = \frac{C_{\text{etanol f}}}{0,511 \times C_{\text{ART}_i}} \times 100 \quad (3.6)$$

Em que:

$Y_{p/s}$  = rendimento de etanol formado em relação aos ART inicial (%);

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

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

### 3.4.2 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 3.7.

$$Pr_{\text{etanol}} = \frac{C_{\text{etanol f}}}{t} \quad (3.7)$$

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).

### 3.4.3 Concentração de etanol expressa em percentagem volumétrica % (v/v)

A concentração de etanol pode ser expressa também em percentagem volumétrica, que representa a relação entre o volume de etanol puro pelo volume total da suspensão. A percentagem volumétrica pode ser obtida através da Equação 3.8.

$$\% \left( \frac{v}{v} \right) = \frac{C_{\text{etanol f}}}{789} \times 100 \quad (3.8)$$

Em que:

$\% \left( \frac{v}{v} \right)$  = Teor alcoólico expresso em percentagem volumétrica;

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

Densidade do etanol puro à 25°C = 789 g/L

---

## CAPÍTULO 4

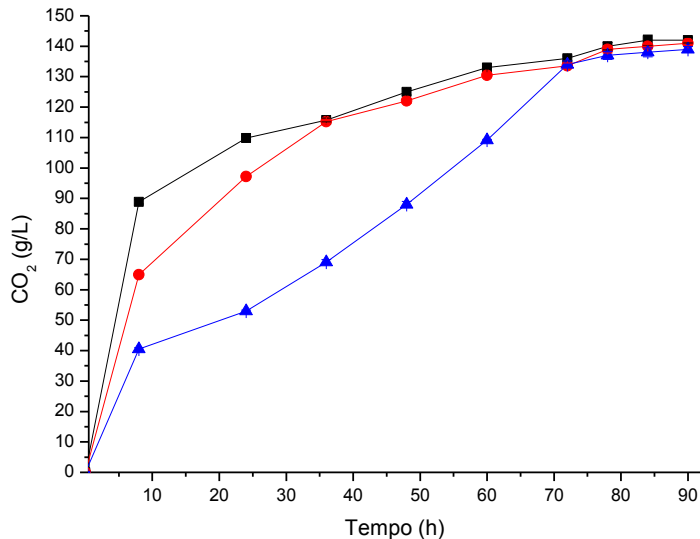
### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

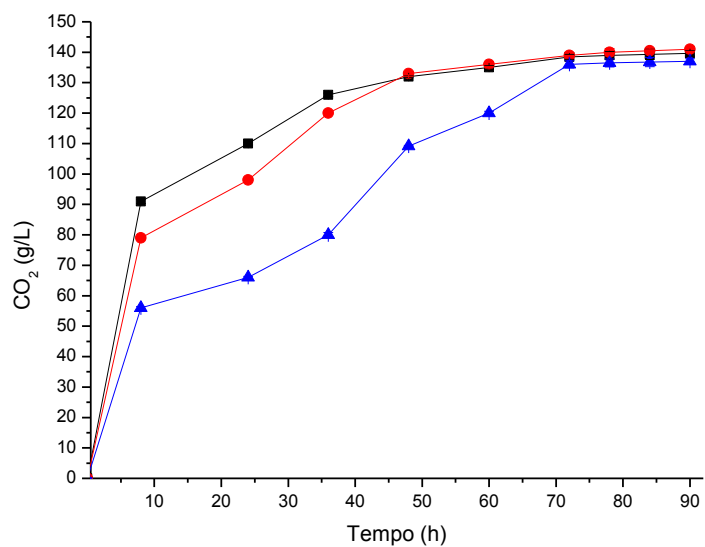
Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho.

#### 4.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS TEMPOS DE FERMENTAÇÃO EM BATELADA PARA DIFERENTES TEMPERATURAS

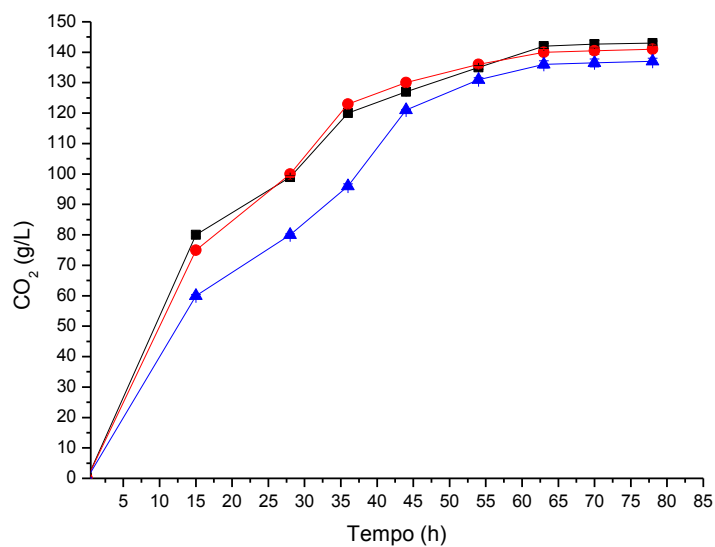
Com o objetivo de avaliar os tempos de fermentação empregando as cepas Ethanol Red, Y-904 e PE-2, para cada temperatura empregada, para fermentações em VHG, na concentração inicial de ART igual a 300 g/L, foram realizados experimentos nos quais acompanhava-se a produção de CO<sub>2</sub> ao longo do tempo. Os resultados destas fermentações preliminares são apresentados nas Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5 para 20, 23, 25, 27 e 30 °C, respectivamente.



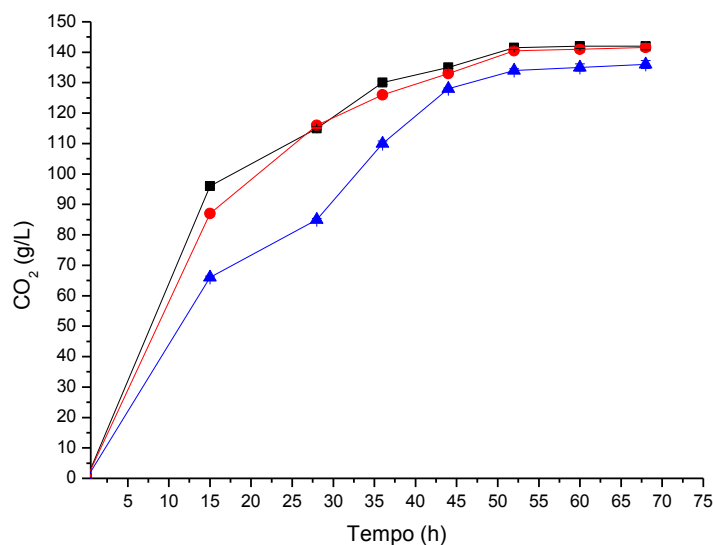
**Figura 4.1** – Perfil de produção de CO<sub>2</sub> para —■— Ethanol Red, —●— Y-904 e —▲— PE-2 na temperatura de 20°C



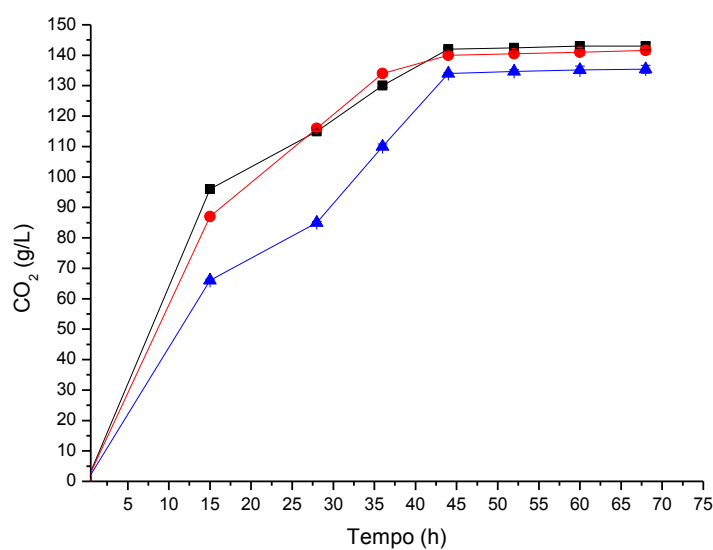
**Figura 4.2** – Perfil de produção de  $\text{CO}_2$  para —■— Ethanol Red, —●— Y-904 e —▲— PE-2 na temperatura de 23°C



**Figura 4.3** – Perfil de produção de  $\text{CO}_2$  para —■— Ethanol Red, —●— Y-904 e —▲— PE-2 na temperatura de 25°C



**Figura 4.4** – Perfil de produção de  $\text{CO}_2$  para —■— Ethanol Red, —●— Y-904 e —▲— PE-2 na temperatura de 27°C



**Figura 4.5** – Perfil de produção de  $\text{CO}_2$  para —■— Ethanol Red, —●— Y-904 e —▲— PE-2 na temperatura de 30°C

O tempo final definido para o término de cada ciclo fermentativo, para cada temperatura e estirpe estudada foi baseado no final da fase logarítmica, que corresponde ao momento em que cessa a produção de gás carbônico. Esta fase logarítmica corresponde ao período em que a atividade metabólica da célula é máxima, sendo o estágio preferido para fins

industriais, pois o produto necessário seria produzido eficientemente. De posse destes resultados, os tempos definidos para realização dos experimentos em batelada repetida foram estipulados em 78, 72, 63, 52 e 44 horas para as temperaturas 20, 23, 25, 27 e 30°C, respectivamente, empregando o mesmo meio de cultivo.

Conforme relatado por Pereira et al. (2011), a viabilidade de leveduras diminui abruptamente quando o processo de fermentação desacelera e, assim, a recuperação da levedura para reciclagem para fermentações subsequentes deve ser feita nessa fase crítica, para manter altos níveis de viabilidade durante os próximos ciclos de fermentações.

## **4.2 FERMENTAÇÕES EM BATELADAS REPETIDAS COM DIFERENTES CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* EM FERMENTAÇÕES VHG EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

### **4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2**

Os valores médios dos resultados das fermentações VHG em batelada repetida, realizados em triplicata, em diferentes temperaturas (20 a 30°C), para a concentração inicial de glicose de 300 g/L, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 são apresentados na Tabela 4.1.

O desempenho da cepa PE-2 foi avaliado em um processo de fermentação VHG em bateladas repetidas operado por 5 ciclos com reciclagem celular, em diferentes temperaturas.

**Tabela 4.1** – Respostas avaliadas em ciclos de fermentação em batelada repetida para diferentes temperaturas empregando a estirpe PE-2.

PE-2	Ciclo		Tempo de Fermentação (h)	Etanol Final (g/L)	Glicose Residual (g/L)	Teor Alcoólico (% v/v)	Produtividade Etanol (g/L.h)	Rendimento (%)
	20 °C	1	78	138	0	17,5	1,77	90,0
		2	78	140	0	17,7	1,79	91,3
		3	78	137	0	17,4	1,76	89,4
		4	78	133	0	16,8	1,70	86,7
		5	78	134	0	17,0	1,72	87,4
	23 °C	1	72	136	0	17,2	1,89	88,7
		2	72	135	0	17,1	1,88	88,0
		3	72	130	0	16,5	1,80	84,8
		4	72	131	0	16,6	1,82	85,0
		5	72	130	0	16,5	1,80	84,8
	25 °C	1	63	134	0	17,0	2,13	87,4
		2	63	136	0	17,2	2,16	88,7
		3	63	133	0	16,8	2,11	86,7
		4	63	132	0	16,7	2,09	86,1
		5	63	129	0	16,3	2,05	84,1
	27 °C	1	52	137	0	17,4	2,63	89,4
		2	52	132	0	16,7	2,54	86,1
		3	52	134	0	17,0	2,58	87,4
		4	52	130	0	16,5	2,50	84,8
		5	52	131	0	16,6	2,52	85,0
	30 °C	1	44	135	0	17,1	3,07	88,0
		2	44	130	0	16,5	2,95	84,8
		3	44	128	0	16,2	2,91	83,5
		4	44	130	0	16,5	2,95	84,8
		5	44	126	0	15,9	2,86	82,2

Estudou-se o desempenho da estirpe PE-2 em fermentações com altos teores de glicose inicial, avaliando o impacto de diferentes temperaturas. Observou-se que a produtividade é menor em temperaturas mais baixas, devido ao tempo de fermentação ser maior.

Na indústria, é prática comum reciclar a biomassa de levedura por vários lotes consecutivos, a fim de reduzir o tempo e o custo para a preparação do inóculo. Por exemplo, na fermentação para produção de cerveja, a levedura é reutilizada de 5 a 20 vezes, dependendo da cervejaria em particular (HUUSKONEN et al., 2010).

Nas destilarias brasileiras de etanol, a levedura também é reciclada por centrifugação e, em muitos casos, a reciclagem se estende por 8 meses, durante a época da colheita da cana-de-açúcar (BASSO et al., 2008).

Além disso, o uso de processos sucessivos de fermentação em batelada repetida com reciclagem de células permite o acúmulo de altas densidades celulares que podem aumentar a produtividade do etanol nos sistemas (VAN HOEK et al., 2000).

Para a faixa de temperatura estudada de 20 a 30°C, em todos os ciclos de fermentação toda a glicose foi consumida, permitindo a produção de altos níveis de etanol de 16,3 a 17,7% (v/v) com rendimento de etanol de 84,1 a 91,3%. Além disso, a produtividade de etanol nos ciclos nestas temperaturas variou de 1,72 a 2,63 g/L.h.

Na temperatura de 30°C, a produção de etanol foi alta, 15,9 – 17,1 % (v/v), com rendimento de etanol de 82 – 88% e produtividade de 2,86–3,07 g/L.h nesta temperatura. Os resultados obtidos nesta pesquisa para PE-2, estão bastante semelhantes aos de Pereira et al. (2012), ao comparar os resultados obtidos por eles, em que realizaram bateladas repetidas operando por 15 ciclos, utilizando a mesma cepa (PE-2) na temperatura de 30°C, empregando concentração de glicose em torno de 300 g/L. Nos primeiros cinco ciclos de fermentação, quase toda a glicose foi consumida (residual <17 g/L), permitindo a produção de altos níveis de etanol de 17% (v/v) com rendimento de etanol de 78 – 82% e produtividade variando de 3,45 a 4,59 g/L.h.

Pereira et al. (2012), realizando fermentações com a stirpe PE-2 em meio de cultura otimizado para fermentações VHG com 364 g/L de glicose a 27 e 30°C, observaram que as células de levedura fermentaram a maior parte da glicose (residual de 6 e 35 g/L, respectivamente), atingindo teores de etanol de 21,6 e 19,3% (v/v) e produtividade em etanol de 1,31 e 1,60 g/L.h, respectivamente. Assim, como esperado, a diminuição da temperatura de fermentação para 27°C resultou no aumento do consumo de glicose e no teor final de etanol, embora a produtividade de etanol tenha diminuído. Além disso, a linhagem PE-2 apresentou alta tolerância a estresse osmótico, crescendo e fermentando em meio VHG com 400 g/L de glicose. No entanto, as fermentações VHG foram incompletas, deixando o residual de 60 e 80 g/L de glicose e atingindo 20,1 e 18,2% (v/v) de etanol a 27 e 30°C, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos obtidos por Pereira et al. (2012), uma vez que, utilizando o mesmo meio de cultura otimizado para fermentações VHG com 300 g/L de glicose, as fermentações realizadas a 27°C foram melhores em termos de

concentração de etanol em relação às realizadas a 30°C. Obteve-se teores de etanol de 17,4 e 17,1% (v/v) com produtividade de 2,63 e 3,07 g/L.h para as temperaturas de 27 e 30°C, respectivamente.

A tolerância da levedura ao etanol é afetada negativamente pelo aumento da temperatura de fermentação (CASEY E INGLEDEW, 1986). Thomas et al. (1993) testaram a fermentação VHG de mosto derivado de trigo a 20, 25, 30 e 35°C e descobriram que as fermentações foram completas a 20 e 25°C enquanto se tornavam lentas e incompletas a 30 e 35°C. Com a suplementação do meio com extrato de levedura, a 20°C, a concentração de etanol produzido foi de 23,8% (v/v), caindo para 18% (v/v) a 30°C.

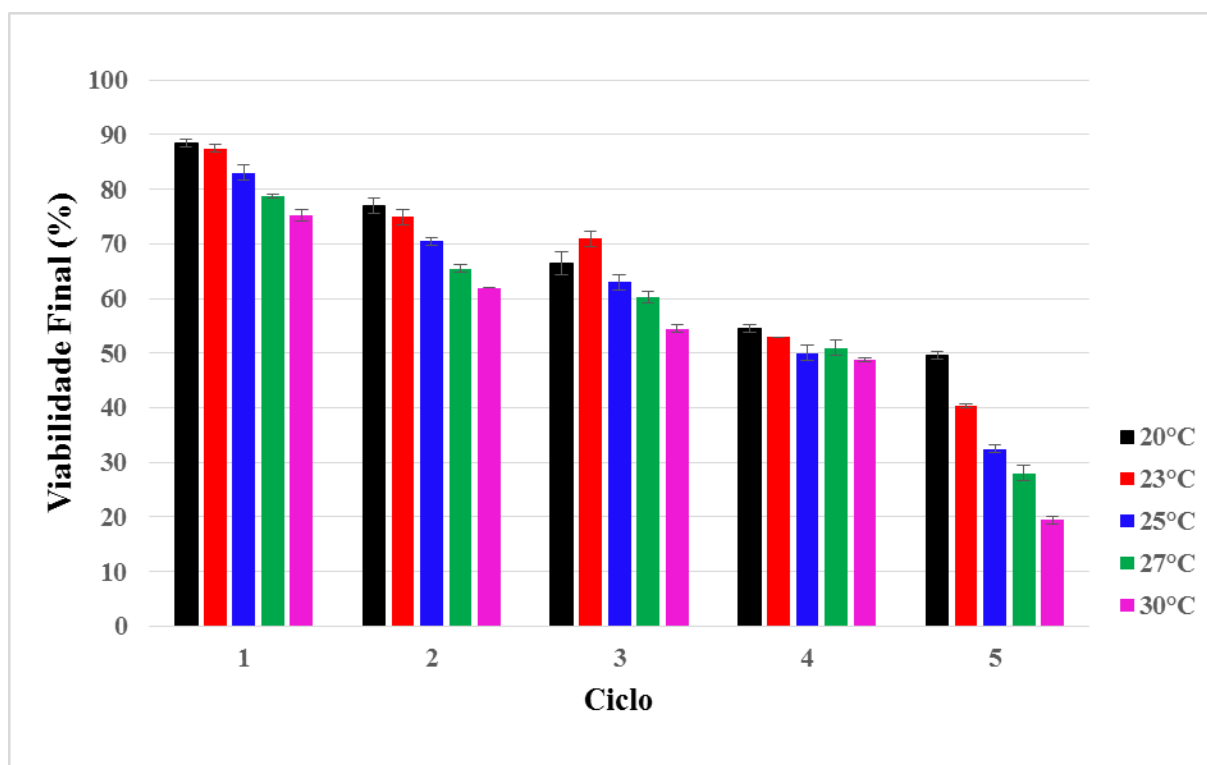
No presente trabalho, empregando a cepa PE-2, observa-se que a 20°C o teor alcoólico máximo atingido foi de 17,7% (v/v) no segundo ciclo, enquanto a 30°C o teor máximo atingido foi de 17,1% (v/v) no primeiro ciclo. Ambas as fermentações foram completas, ou seja, a glicose residual foi igual a zero.

Cerqueira (2013), também obteve altas concentrações de etanol em seu estudo de fermentações VHG (em mostos com 25, 30 e 35 °Brix) com a levedura PE-2. Para a fermentação em mostos com 25 °Brix, os valores de etanol obtidos foram os melhores e variaram de 9,88% (v/v) no 1º ciclo e 14,43% (v/v) no 6º ciclo.

Monteiro (2016), utilizando a linhagem PE-2 em mosto de caldo-de-cana concentrado a 30 °Brix suplementado com fosfato de amônio ou com ureia obteve-se respectivamente 15,84 e 15,82 % (v/v) de etanol no 6º ciclo fermentativo, comparativamente ao mosto controle, sem suplementação que produziu 14,99% (v/v).

A alta viabilidade das células de levedura é vital para o processo funcionar de forma eficiente. A Figura 4.6 apresenta a viabilidade final ao longo dos ciclos nas diferentes temperaturas estudadas para a cepa PE-2.

Observou-se que em diferentes temperaturas para a mesma concentração inicial de substrato, a viabilidade é maior quanto menor for a temperatura. No final do ciclo 5, a viabilidade caiu para 20, 29, 33, 40 e 49% nas fermentações realizadas a 30, 27, 25, 23 e 20°C respectivamente, porém os teores de etanol permaneceram elevados, cerca de 17%(v/v).



**Figura 4.6** – Viabilidade final ao longo dos ciclos para as temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C para a estirpe PE-2.

Quanto maior foi a temperatura, menor foi a viabilidade ao longo dos 5 ciclos estudados. A queda de viabilidade do quarto para o quinto ciclo a 30°C, foi a mais acentuada, dentre as demais temperaturas e demais ciclos estudados.

Observa-se que, a maior diferença de viabilidade do primeiro para o quinto ciclo foi de 56% a 30°C e a menor de 40% a 20°C.

A viabilidade da estirpe PE-2 está intimamente ligada a temperatura em que a fermentação é realizada. É possível observar uma maior queda na viabilidade para a levedura PE-2 a 30°C quando se trabalha reutilizando a levedura. Isto sugere que nesta temperatura a viabilidade será menor que 20% nos ciclos subsequentes comprometendo a conversão de substrato a etanol. Já a 20°C após 5 ciclos de reutilização da levedura, a viabilidade encontra-se próxima dos 50%, sugerindo que possivelmente a levedura suportaria mais ciclos fermentativos.

#### 4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red

Os valores médios dos resultados das fermentações VHG em batelada repetida, realizados em triplicata, em diferentes temperaturas, para a concentração inicial de glicose de 300 g/L, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red são apresentados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2** – Respostas avaliadas em ciclos de fermentação em batelada repetida para diferentes temperaturas empregando a estirpe Ethanol Red.

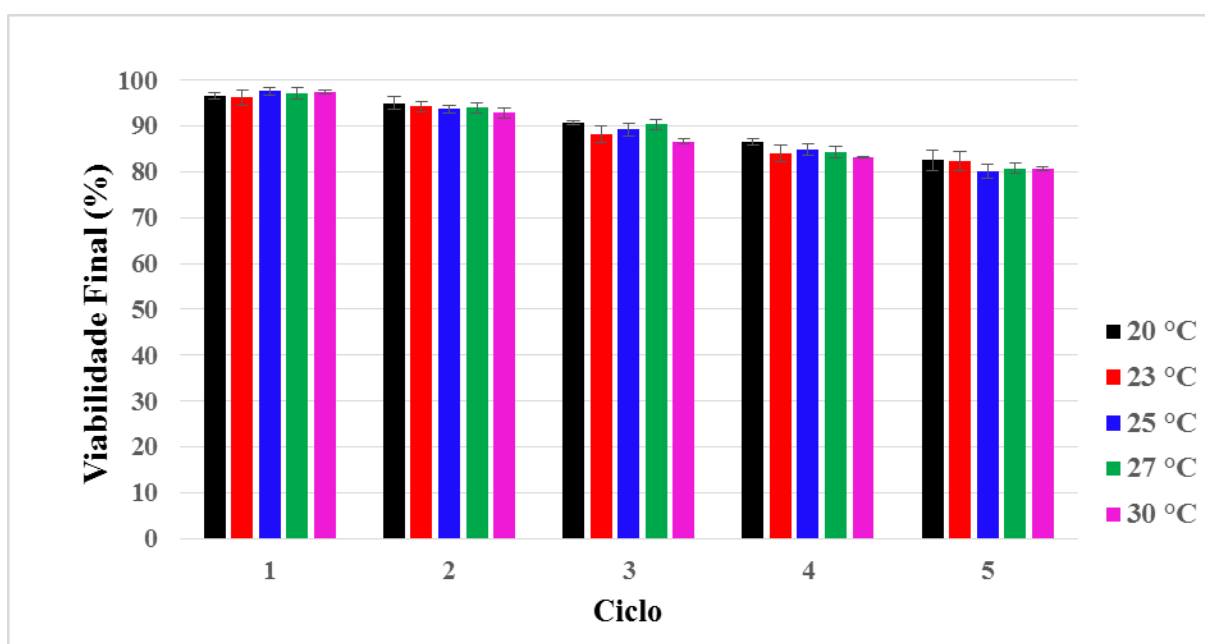
	Ciclo		Tempo de Fermentação (h)	Etanol Final (g/L)	Glicose Residual (g/L)	Teor Alcoólico (% v/v)	Produtividade Etanol (g/L.h)	Rendimento (%)
Ethanol Red	20 °C	1	78	143	0	18,1	1,83	93,3
		2	78	141	0	17,9	1,81	92,0
		3	78	142	0	18,0	1,82	92,6
		4	78	142	0	18,0	1,82	92,6
		5	78	142	0	18,0	1,82	92,6
	23 °C	1	72	140	0	17,7	1,94	91,3
		2	72	138	0	17,5	1,92	90,0
		3	72	141	0	17,9	1,96	92,0
		4	72	140	0	17,7	1,94	91,3
		5	72	140	0	17,7	1,94	91,3
	25 °C	1	63	142	0	18,0	2,25	92,6
		2	63	143	0	18,1	2,27	93,3
		3	63	140	0	17,7	2,22	91,3
		4	63	141	0	17,9	2,24	92,0
		5	63	141	0	17,9	2,24	92,0
	27 °C	1	52	139	0	17,6	2,25	90,7
		2	52	140	0	17,7	2,27	91,3
		3	52	138	0	17,5	2,22	90,0
		4	52	139	0	17,6	2,24	90,7
		5	52	142	0	18,0	2,24	92,6
	30 °C	1	44	137	0	17,4	3,11	89,4
		2	44	139	0	17,6	3,16	90,7
		3	44	143	0	18,1	3,25	93,3
		4	44	141	0	17,9	3,20	92,0
		5	44	143	0	18,1	3,25	93,3

A faixa de maiores valores de concentração de etanol obtida para as temperaturas estudadas variou de 141 a 143 g/L. A 20°C a concentração de etanol final oscilou menos nos

5 ciclos, de 141 a 143 g/L, do que nas demais temperaturas, como por exemplo a 30°C em que a concentração oscilou de 137 a 143 g/.

A maior produtividade foi de 3,25 g/L.h a 30°C e a menor de 1,81 g/L.h a 20°C.

A viabilidade após cada ciclo para todas as temperaturas estudadas se manteve praticamente constante, havendo uma maior queda de 17% do primeiro para o quinto ciclo na temperatura de 30°C, e a menor de 12% para a temperatura de 20°C (Figura 4.7).



**Figura 4.7** – Viabilidade final ao longo dos ciclos para as temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C para a estirpe Ethanol Red.

Não houve açúcar residual em nenhum ciclo para nenhuma temperatura estudada, todo o açúcar disponível no meio de fermentação foi consumido. Apesar do consumo eficiente da fonte de carbono durante os ciclos sucessivos, os níveis de etanol obtidos experimentalmente por cromatografia líquida foram entre 17,4 e 18,1 % (v/v). Esperar-se-ia obtenção de vinhos em torno de 19,2% (v/v) prevista pelo rendimento teórico, estando os valores obtidos muito próximos deste valor.

Parte desta perda deve ser atribuída a perdas por evaporação, que ocorre durante o processo fermentativo e também devido ao tempo de armazenamento para posterior análise. Nos estudos controles de Barbosa (2013), indicam que pode haver a perda por evaporação de até 2,2% de etanol produzido por hora a 30°C.

Barbosa (2013), utilizando a levedura Ethanol Red, em meio contendo 30% de sacarose, durante 10 ciclos consecutivos de 10 horas cada, a 30 e 37°C obteve teores de etanol que variaram, em um valor médio de 15% (v/v). Obteve-se viabilidade de 90% a 30°C, enquanto a 37°C esse valor foi de 80%. Além disso, dentre as leveduras envolvidas no estudo de Barbosa (2013), a Ethanol Red foi a que apresentou maior sensibilidade ao estresse fermentativo, apresentando um considerável aumento do acúmulo de trealose, indicando a resposta frente ao estresse osmótico e etanólico. Este aumento da quantidade intracelular de trealose é forma de proteção ao estresse metabólico induzido por altas concentrações de açúcar e de etanol, como descrito em vários trabalhos na literatura, refletindo uma forma de proteção celular.

Souza (2014), estudou o desempenho de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* para o máximo acúmulo de etanol, testadas em condições de alta gravidade (VHG). A fermentação foi realizada a 25°C em meio contendo 33% de glicose. A linhagem CB1585 de origem holandesa foi a que obteve melhor desempenho entre as linhagens testadas, produzindo o teor alcoólico de 18,9 % (v/v). A cepa Ethanol Red, também testada por ele, produziu teor alcoólico de 17,58 % (v/v).

### 4.2.3 *Saccharomyces cerevisiae* Y-904

Os valores médios dos resultados das fermentações VHG em batelada repetida, realizados em triplicata, em diferentes temperaturas (20 a 30°C), para a concentração inicial de glicose de 300 g/L, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 são apresentados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** – Respostas avaliadas em ciclos de fermentação em batelada repetida para diferentes temperaturas empregando a estirpe Y-904.

Y-904	Ciclo		Tempo de Fermentação (h)	Etanol Final (g/L)	Glicose Residual (g/L)	Teor Alcoólico (% v/v)	Produtividade Etanol (g/L.h)	Rendimento (%)
	20 °C	1	78	138	0	17,5	1,77	90,0
		2	78	139	0	17,6	1,78	90,7
		3	78	141	0	17,9	1,81	92,0
		4	78	140	0	17,7	1,79	91,3
		5	78	140	0	17,7	1,79	91,3
	23 °C	1	72	136	0	17,2	1,89	88,7
		2	72	138	0	17,5	1,92	90,0
		3	72	140	0	17,7	1,94	91,3
		4	72	139	0	17,6	1,93	90,7
		5	72	138	0	17,5	1,92	90,0
	25 °C	1	63	139	0	17,6	2,21	90,7
		2	63	140	0	17,7	2,22	91,3
		3	63	139	0	17,6	2,21	90,7
		4	63	140	0	17,7	2,22	91,3
		5	63	137	0	17,4	2,17	89,4
	27 °C	1	52	141	0	17,9	2,67	92,0
		2	52	143	0	18,1	2,75	93,3
		3	52	142	0	18,0	2,73	92,6
		4	52	141	0	17,9	2,71	92,0
		5	52	141	0	17,9	2,71	92,0
	30 °C	1	44	138	0	17,5	3,14	90,0
		2	44	140	0	17,7	3,18	91,3
		3	44	141	0	17,9	3,20	92,0
		4	44	139	0	17,6	3,16	90,7
		5	44	139	0	17,6	3,16	90,7

Cruz (2015), utilizando a cepa Y-904 e 300 g/L de sacarose no processo batelada alimentada, obteve teores alcoólicos de 15,0; 17,4 e 15,7 % v/v trabalhando nas temperaturas de 20, 25 e 32°C, respectivamente.

Neste trabalho, utilizando a mesma cepa e concentração de substrato, obteve-se teor alcoólico máximo igual a 18 % v/v para a temperatura de 27°C. Nas temperaturas de 20 e 25°C os teores alcoólicos obtidos foram 17,9 e 17,7 % v/v respectivamente. Essa diferença de teor alcoólico obtido em relação a Cruz (2015), principalmente para as temperaturas iguais estudadas de 20 e 25°C, utilizando a mesma levedura, pode ser devido ao tipo substrato utilizando, glicose neste trabalho e sacarose no de Cruz (2015), tipo de condução do processo e ao tempo de fermentação.

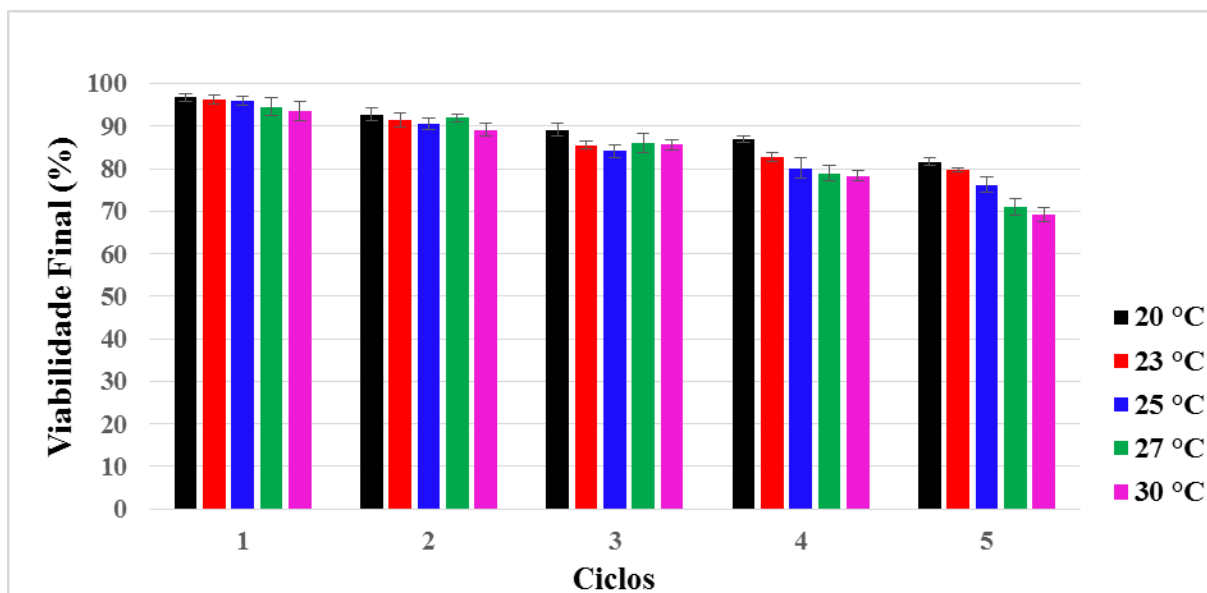
A maior produtividade alcançada foi de 3,2 g/L.h obtida a 30°C, como já era de se esperar, devido ao tempo de fermentação nesta temperatura ser menor que nas demais estudadas.

Cruz (2015), nos seus estudos preliminares com a cepa Y-904, trabalhando em batelada repetida a 20°C e com 189 g/L de sacarose obteve nos três primeiros ciclos teor alcoólico em torno de 11% v/v e rendimentos que foram aumentando gradativamente de aproximadamente 88% até 93%. A viabilidade ao longo dos ciclos manteve-se constante em torno de 92%.

Os resultados obtidos no presente trabalho para a temperatura de 20°C, foram superiores para teor alcoólico, que foi de aproximadamente 18% v/v, visto que a concentração de substrato (glicose) utilizada foi maior (300 g/L), o rendimento ficou em torno de 94% e a viabilidade diminuiu de 97,4 para 90,1% nos três primeiros ciclos, em relação aos resultados obtidos por Cruz (2015).

A máxima concentração de etanol obtida para as temperaturas estudadas variou de 136 a 143 g/L, que corresponde a 17,2 e 18,1 % v/v. Nos cinco ciclos estudados para cada temperatura, a 27°C a concentração de etanol final teve menor oscilação, de 141 a 143 g/L, do que as demais temperaturas.

Um dos fatores que interfere na fermentação alcoólica é a temperatura. O aumento tóxico do etanol, aumenta com o aumento da temperatura, devido ao aumento de fluidez da membrana celular e transporte das substâncias tóxicas para o interior das células (PHISALAPHONG et al., 2006; FERNANDES, 2008) e especificamente para *Saccharomyces cerevisiae*, na faixa de 12 a 28°C, o efeito tóxico do etanol permanece constante e acima disso aumenta com a temperatura (AMORIM et al., 1996). Observa-se pela Figura 4.8 que a estirpe Y-904 segue a premissa acima, o perfil de viabilidade expõe que com o aumento da temperatura a viabilidade diminui gradativamente.



**Figura 4.8** – Viabilidade final ao longo dos ciclos para as temperaturas de 20, 23, 25, 27 e 30°C para a estirpe Y-904.

A queda de viabilidade é maior para a temperatura de 30°C, partindo de 95% no fim do primeiro ciclo e alcançando 70% no fim do quinto ciclo. A menor queda de viabilidade foi obtida a 20°C com a diferença de 15% do primeiro para o quinto ciclo.

Estirpes industriais apresentam uma robustez mais elevada relativamente aos principais estresses que surgem da prática da fermentação VHG (BAI et al., 2008; PEREIRA et al., 2011). Neste estudo, a viabilidade da levedura Y-904 ao longo das fermentações foi superior ou igual a 70%, mesmo com uma constante exposição das células a altas concentrações de etanol.

Tonoli (2015), utilizando a cepa Y-904 em ciclos adaptativos com aumento gradual na concentração de açúcares redutores totais, a 28°C, obteve viabilidade constante, em torno de 85% até o quarto ciclo. Após este ciclo, a viabilidade caiu ciclo após ciclo, chegando a aproximadamente 34% no último ciclo (9º). A queda de viabilidade pode estar relacionada ao aumento da concentração de ART no mosto. No ciclo 4, a concentração de ART no mosto foi de 165 g/L, nos demais ciclos a concentração de ART foi superior a 200 g/L, chegando a 274,5 g/L no ciclo 9. O teor alcoólico máximo obtido foi de 12,7 % v/v, utilizando 260 g/L de ART, no ciclo 7 e o rendimento ao longo dos ciclos variou de 61 a 84%.

#### 4.2.4 Comparação dos resultados obtidos para as cepas PE-2, Ethanol Red e Y-904

A Tabela 4.4 resume os maiores valores de viabilidade e concentração de etanol final obtidos pelas cepas Ethanol Red, Y-904 e PE-2 nas temperaturas estudadas.

**Tabela 4.4** – Resumo da viabilidade e concentração de etanol a diferentes temperaturas para as cepas Ethanol Red, Y-904 e PE-2

Temperatura (°C)	Cepas	Concentração de etanol (g/L)	Viabilidade (%)
20	Ethanol Red	143	98,3
	Y-904	141	97,4
	PE-2	140	89,0
23	Ethanol Red	141	97,4
	Y-904	140	97,1
	PE-2	136	87,0
25	Ethanol Red	143	98,1
	Y-904	140	96,6
	PE-2	136	84,0
27	Ethanol Red	142	98,0
	Y-904	143	96,1
	PE-2	137	79,0
30	Ethanol Red	143	97,6
	Y-904	141	95,0
	PE-2	135	76,0

A fermentação alcoólica em batelada repetida realizada a diferentes temperaturas pode ser uma forma de testar a resistência das linhagens de levedura. Isso pode então ser usado como um método para determinar a condição ideal para a fermentação e também um critério para selecionar rapidamente uma das várias cepas e, ao mesmo tempo, estudar a resistência à temperatura em uma situação controlada, isto é, sob condições de laboratório (LIN et al., 2012).

As linhagens industriais fermentaram eficientemente o monossacarídeo, uma vez que as leveduras são organismos glicofílicos. A concentração final de etanol para Ethanol Red e Y-904 obtida em todas as temperaturas estudadas foi a mesma e na faixa de 141 – 143 g/L, gerando um teor final de etanol próximo de 18 %v/v, muito próximo do previsto pelo rendimento teórico de 19,4 %v/v. Os valores obtidos pela estirpe PE-2 foram inferiores, porém bastante relevantes.

Segundo Alves (1994), as leveduras quando fermentam em ambientes estressantes apresentam diminuição da viabilidade celular, aumento da formação de glicerol e redução da formação de biomassa, sendo tais parâmetros de extrema utilidade para identificação de linhagens tolerantes a um único ou a um conjunto de fatores estressantes.

A influência da temperatura nos parâmetros cinéticos deve ser considerada, pois geralmente quando se trabalha em larga escala é difícil manter uma temperatura constante durante a fermentação alcoólica. O processo é exotérmico e pequenos desvios de temperatura (2 – 4°C) podem desviar o processo das condições operacionais ideais. Além disso, o conhecimento sobre o efeito da temperatura na cinética de fermentação do etanol pode ser útil em estratégias de otimização de processos (ATALA et al., 2001).

Houve pouca variação da viabilidade celular entre as estirpes Ethanol Red e Y-904, a PE-2 foi a que apresentou maior sensibilidade ao estresse fermentativo em todas as temperaturas estudadas, sendo esse estresse mais evidente na temperatura de 30°C.

As cepas Ethanol Red e Y-904 demonstraram comportamento semelhantes na produção de etanol e viabilidade final, no estudo realizado em processos sucessivos de fermentação em batelada repetida com reciclagem de células. Sendo assim, a cepa Y-904 foi a escolhida para dar continuidade nos estudos dos experimentos seguintes, por dispor de maior quantidade no laboratório em que a pesquisa foi realizada.

É importante lembrar que no reciclo celular nas destilarias brasileiras, o mosto é centrifugado, o leite de levedura obtido é diluído com água e tratado com ácido sulfúrico, havendo aí uma eliminação de contaminantes e leveduras mortas. No desenvolvimento do presente trabalho, após o término das fermentações, a levedura recuperada foi reutilizada sem nenhum tratamento. Possivelmente se fosse tratada, poderia ser utilizada uma safra inteira.

### 4.3 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA CONJUNTA DA TEMPERATURA, CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO E CÉLULA

#### 4.3.1 Caracterização do caldo e melaço de cana-de-açúcar

Para os experimentos do delineamento composto central foram empregados como fonte de açúcar, melaço e caldo-de-cana que foram caracterizados em termos de concentração de sais, conforme apresentados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** - Composições minerais do caldo e melaço de cana-de-açúcar

Mineral	Caldo-de-cana BP ppm (mg/L)	Melaço BP ppm (mg/L)
Cálcio	136	528
Cobre	0,1	4,2
Ferro	4	43
Fosforo	38	655
Magnésio	128	1054
Manganês	1,1	11
Nitrogênio Total	339,3	3331
Potássio	246	3090
Zinco	0,9	4,3

O caldo contém a água, ou seja, a umidade da cana, e os sólidos solúveis totais, que correspondem aos açúcares e não açúcares. Os sólidos solúveis são classificados em açúcares, sendo esses a sacarose, a glicose e a frutose, compostos orgânicos e materiais inorgânicos. A medida dos sólidos solúveis é denominada °Brix.

A concentração de açúcares redutores totais obtidos no melaço e caldo de cana foram de 718,5 e 125,5 g/L respectivamente.

Os compostos inorgânicos encontrados no caldo e melaço de cana são fósforo, enxofre, cálcio, magnésio, potássio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas, sendo todos necessários para suprir as necessidades nutricionais das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica industrial, influenciando na multiplicação e crescimento celular e na eficiência de transformação de açúcar em álcool (SANTOS, 2008).

A Tabela 4.6 apresenta as concentrações dos principais nutrientes minerais para uma boa fermentação alcoólica, descritas por Amorim (1977). Tais nutrientes podem já estar presentes no mosto, sendo desnecessárias adições. Entretanto, podem ocorrer teores inadequados e deficiência de alguns e concentrações excessivas de outros (LIMA et al., 2001).

**Tabela 4.6** – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica. Fonte: AMORIM, 1977

Nutrição Mineral	Concentração (mg/L)	Nutrição mineral	Concentração (mg/L)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	40 – 5900	Co <sup>++</sup>	3,5
P	62 – 560	Zn <sup>++</sup>	0,5 – 10
K <sup>+</sup>	700 – 800	Cu <sup>++</sup>	7
Ca <sup>++</sup>	120	Mn <sup>++</sup>	10 – 33
Mg <sup>++</sup>	70 – 200	Fe <sup>++</sup>	0,2
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7 – 280	Na <sup>+</sup>	200

O íon de magnésio está sendo muito estudado como atenuantes dos efeitos nocivos de estresse, principalmente o estresse térmico e etanólico, em leveduras *S. Cerevisiae*. Porém, Monaco (2007), utilizando a cepa Y-904 cultivadas em meio a base de caldo de cana-de-açúcar, enriquecidos ou não com magnésio, obteve respostas semelhantes para os estresses térmicos e etanólico, concluindo que o magnésio suplementado não promove proteção adicional às células de levedura sob as condições de estresse, isso porque, provavelmente a quantidade de magnésio naturalmente disponível no caldo de cana é suficiente para a proteção das células.

Segundo Fernandes (2003), a composição do caldo sofre variabilidade quantitativa e qualitativa, tanto entre locais de cultivo como entre as variedades de cana.

De acordo com os dados encontrados na literatura, as concentrações obtidas na caracterização do caldo e melaço utilizados neste trabalho estão dentro da faixa esperada, com quantidades suficientes para suprir as necessidades nutricionais de crescimento, metabolismo e fisiologia das células de leveduras, sendo assim, não houve necessidade de acréscimo de minerais.

### 4.3.2 Estudo da influência conjunta da temperatura, concentrações de substrato e célula

A Tabela 4.7 apresenta os valores codificados e reais das variáveis de estudo e as respostas concentração de açúcar residual, rendimento percentual  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{ART}}$ , concentração de etanol e produtividade de etanol, todas estas variáveis foram analisadas durante 30 horas de processo fermentativo. O tempo de enchimento do reator batelada alimentada foi de 5 horas para todos os experimentos e o pH do caldo foi ajustado em 4,5.

**Tabela 4.7** - Variáveis utilizadas no DCCR e suas respostas em 30 horas de fermentação

Experimentos	Valor real (Valor codificado)			Açúcar residual (g/L)	Rendimento (%)	Concentração de etanol (g/L)	Produtividade ( $g_{\text{etanol}}/L.h$ )
	T°C (X <sub>1</sub> )	S <sub>0</sub> g/L (X <sub>2</sub> )	X <sub>0</sub> % v/v (X <sub>3</sub> )				
1	23 (-1)	270 (-1)	8 (-1)	84.3	68.9	95.0	3.17
2	23 (-1)	270 (-1)	14 (+1)	64.3	76.1	105.0	3.50
3	27 (+1)	270 (-1)	8 (-1)	33.1	79.0	109.0	3.63
4	27 (+1)	270 (-1)	14 (+1)	5.8	92.8	128.0	4.27
5	23 (-1)	350 (+1)	8 (-1)	112.4	65.4	117.0	3.90
6	23 (-1)	350 (+1)	14 (+1)	101	71.0	127.0	4.23
7	27 (+1)	350 (+1)	8 (-1)	110	68.2	122.0	4.07
8	27 (+1)	350 (+1)	14 (+1)	9.9	92.3	165.0	5.50
9	25 (0)	242.7 (- $\alpha$ )	11 (0)	0.5	91.9	114.0	3.80
10	25 (0)	377.3 (+ $\alpha$ )	11 (0)	106.2	71.6	138.0	4.60
11	21.6 (- $\alpha$ )	310 (0)	11 (0)	79.4	73.9	117.0	3.90
12	28.3(+ $\alpha$ )	310 (0)	11 (0)	9.9	85.9	136.0	4.53
13	25 (0)	310 (0)	5.95 (- $\alpha$ )	101	66.9	106.0	3.53
14	25 (0)	310 (0)	16 (+ $\alpha$ )	9.9	92.2	146.0	4,87
15 (C)	25 (0)	310 (0)	11 (0)	21.2	90.3	143.0	4.77
16 (C)	25 (0)	310 (0)	11 (0)	18.1	88.4	140.0	4.67
17 (C)	25 (0)	310 (0)	11 (0)	19.7	89.6	142.0	4.73

Para analisar os dados apresentados na Tabela 4.7, utilizou-se uma probabilidade de rejeição de 10% para a hipótese nula no teste *t de Student* para as seguintes variáveis independentes: temperatura (T), concentrações celular (X<sub>0</sub>) e de substrato no reator (S<sub>0</sub>).

Observa-se na Tabela 4.7 que no tempo igual a 30 horas propostas de fermentação, a concentração de açúcar residual variou de 0,50 g/L (experimento 9) a 112,40 g/L (experimento 5), o rendimento variou de 65,4% (experimento 5) a 92,8% (experimento 4).

A concentração de etanol e produtividade de etanol esteve entre 95 g/L e 3,17 g<sub>etanol</sub>/L.h (experimento 1) e 165,0 g/L e 5,50 g<sub>etanol</sub>/L.h (experimento 8), respectivamente. É interessante notar que os experimentos 1 e 8, representam os experimentos em que todas as variáveis são pontos dos níveis inferiores e superiores do delineamento, respectivamente. Logo para estes experimentos foram obtidos os menores (Experimento 1) e maiores (Experimento 8) resultados de todo delineamento composto central.

Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação em todas as respostas da triplicata indicando uma boa repetibilidade do processo.

As Equações (4.1) e (4.2), descrevem os modelos empíricos ajustados para concentração de etanol e produtividade, respectivamente, em relação às variáveis testadas. Os parâmetros não significativos, que puderam ser desprezados para o nível de significância adotado, foram: interações entre as variáveis T e S<sub>0</sub> e S<sub>0</sub> e X<sub>0</sub>, em que a variável S<sub>0</sub> não exerceu influência significativa sobre a concentração de etanol e produtividade por interações com as outras variáveis. Para essas equações, os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) foram ambos iguais a 0,93. Este resultado indica que 93% dos dados experimentais se encaixam nos modelos apresentados nas Equações (4.1) e (4.2).

$$C_{\text{etanol}} = 141,886 + 8,079X_1 - 6,226X_1^2 + 9,836X_2 - 6,461X_2^2 + 10,899X_3 - 6,499X_3^2 + 5,250X_1X_3 \quad (4.1)$$

$$Pr_{\text{etanol}} = 4,730 + 0,269X_1 - 0,208X_1^2 + 0,328X_2 - 0,215X_2^2 + 0,364X_3 - 0,217X_3^2 + 0,176X_1X_3 \quad (4.2)$$

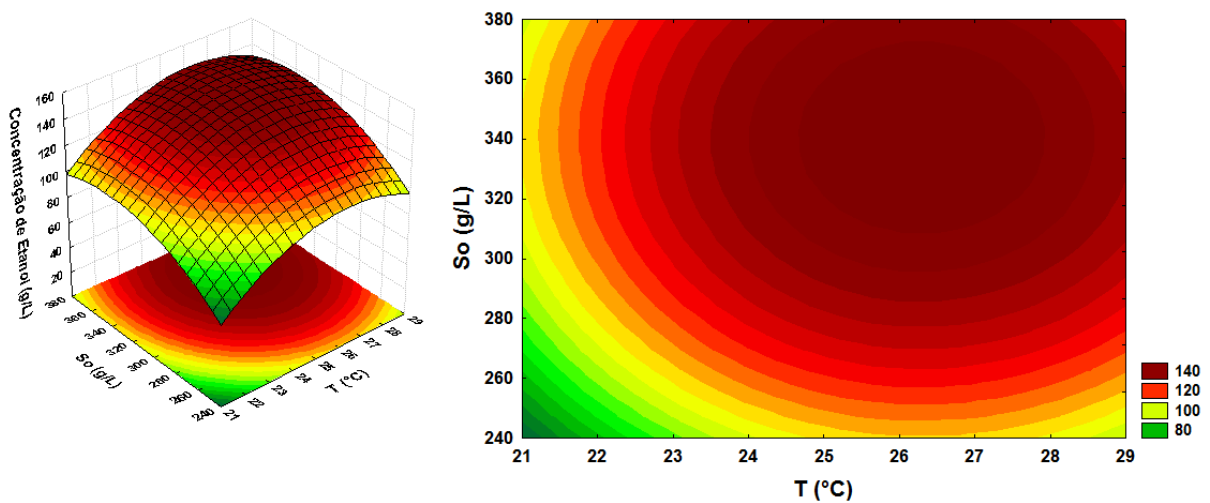
Os valores positivos para os coeficientes de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> nas equações (4.1) e (4.2) indicam que, quando a fermentação é realizada em valores mais altos de temperatura, concentração de substrato e de células, a concentração de etanol e a produtividade aumentam. Este resultado é exemplificado comparando as experimentos 1 e 8 listados na Tabela 4.7. Ao relacionar os experimentos 7 e 8, em que, a concentração de substrato no reator corresponde a 350 g/L e a temperatura a 27°C, diferindo somente na concentração de células no reator para

os dois experimentos, o experimento 8 em que a concentração foi de 14 % resultou na maior concentração de etanol e produtividade do delineamento composto central, no valor de 165 g/L que corresponde a aproximadamente 21 % v/v e 5,50 g/L.h em produtividade de etanol, comprovando a influência da alta concentração celular na produção de etanol utilizando a tecnologia VHG.

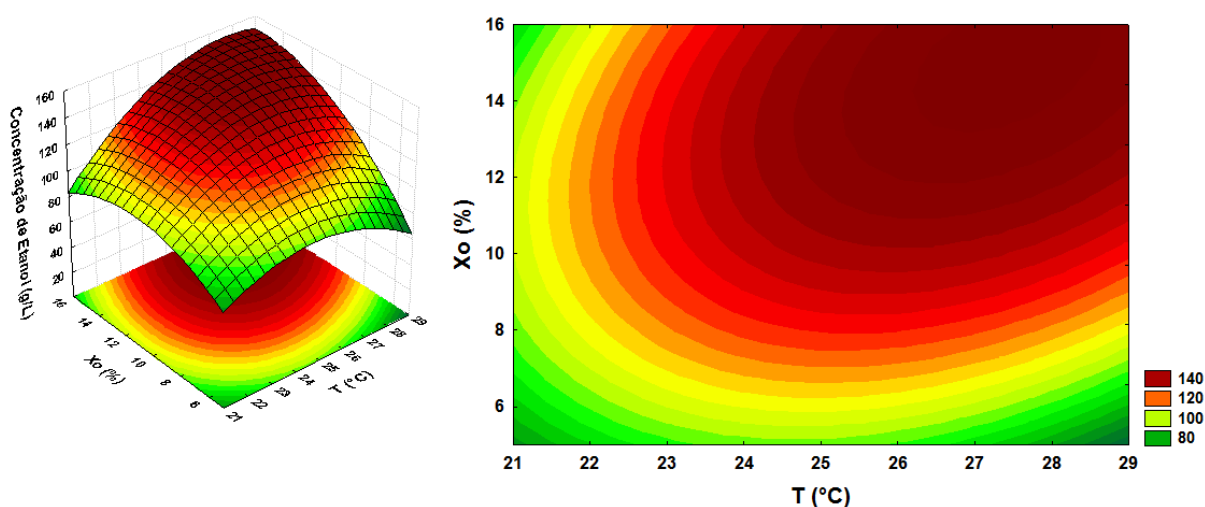
Analisando os coeficientes das variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  nas equações 4.1 e 4.2 verifica-se que a variável que mais influenciou nas respostas produtividade e concentração de etanol foi a concentração celular.

Por se tratar de um delineamento que visa otimizar três variáveis de processo, as variáveis serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada.

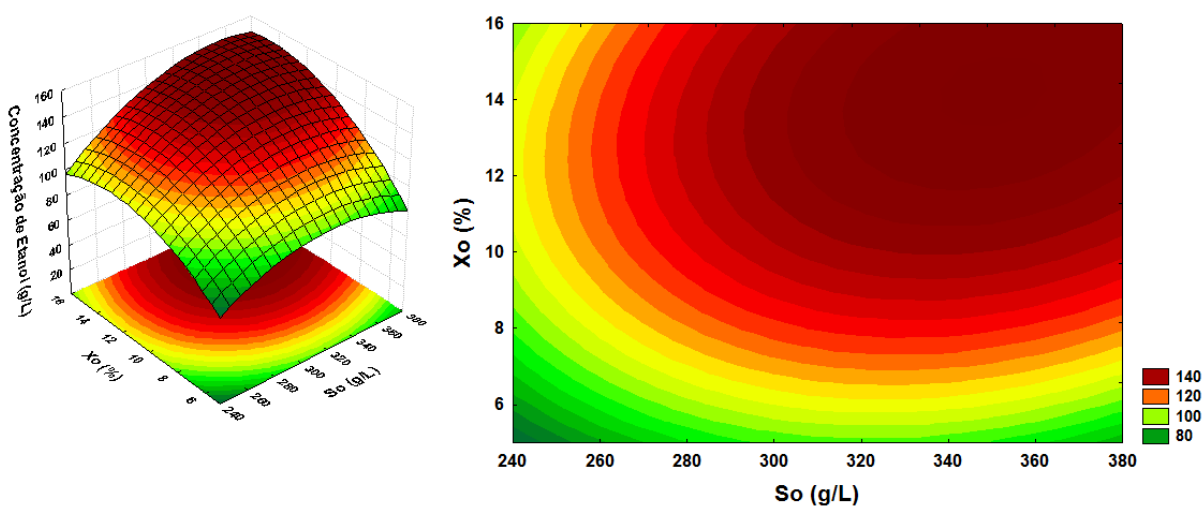
Sendo assim, as Figura 4.9, 4.10 e 4.11 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta concentração de etanol em função de  $T$  e  $S_0$ ;  $T$  e  $X_0$ ; e  $S_0$  e  $X_0$ , respectivamente.



**Figura 4.9** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função da concentração de substrato e da temperatura



**Figura 4.10** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função da concentração celular e da temperatura



**Figura 4.11** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de etanol em função da concentração celular e da concentração de substrato

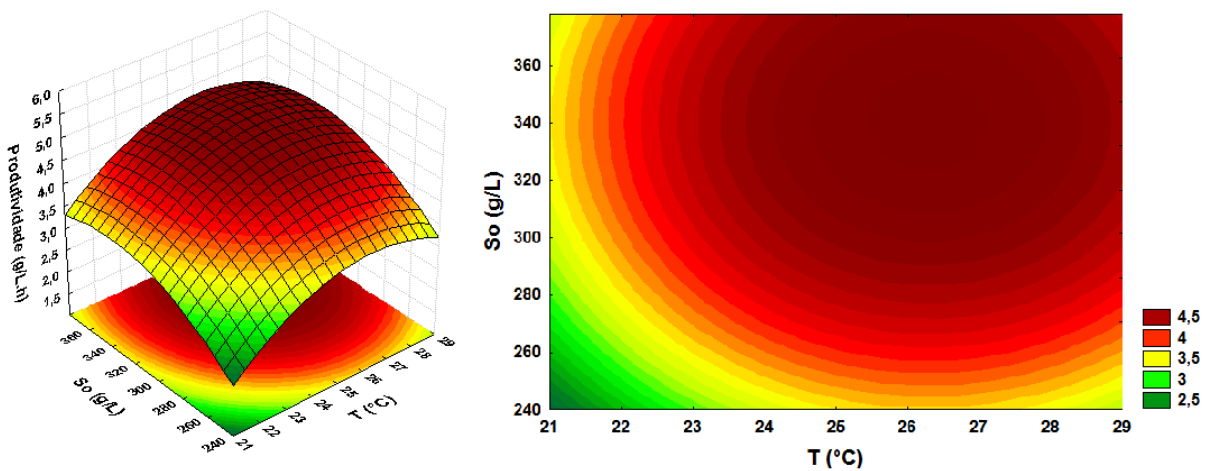
Analisando as curvas de contorno das Figuras 4.9, 4.10 e 4.11 definiu-se as faixa de temperatura, concentrações de substrato e celular que maximiza a concentração final de etanol.

A curva de contorno que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração de substrato (Figura 4.9) indica uma faixa aproximada de 24 a 28°C para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura com a concentração celular (Figura 4.10) indica uma faixa de 25 a 29°C. Portanto, a faixa de temperatura que satisfaz ambos os efeitos combinados, está entre 25 e 28°C.

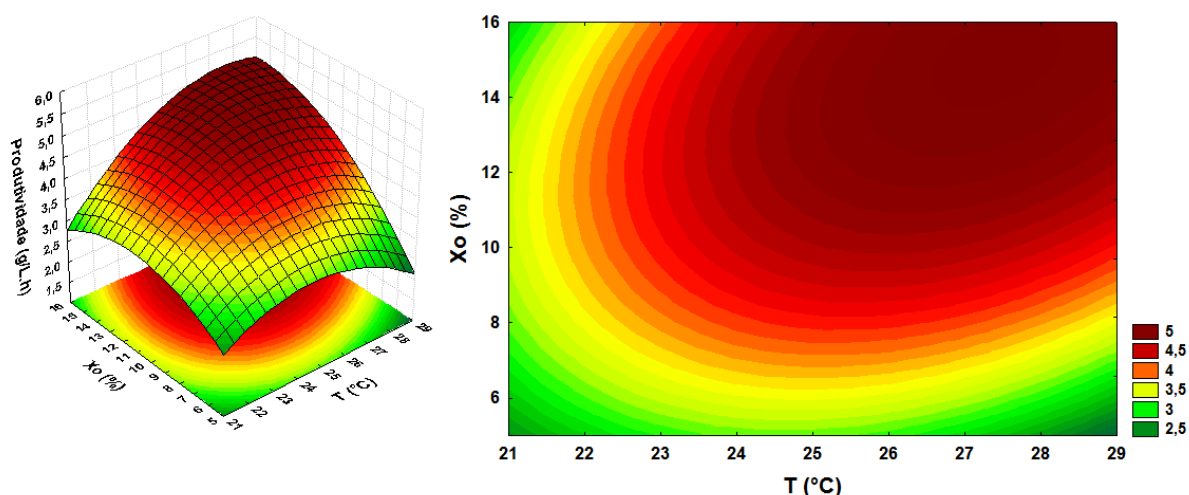
A mesma análise foi feita para concentração de substrato e concentração celular. Através das Figuras 4.9 e 4.11 a faixa de concentração de substrato que maximiza a concentração de etanol está entre 300 e 377,3 g/L para ambos os efeitos combinados. E a partir das Figuras 4.10 e 4.11 as faixas de concentração celular obtidas foram 12 a 16% e 10 a 16% respectivamente. Sendo assim a faixa que satisfaz os efeitos combinados foi de 12 a 16%.

O experimento que obteve-se a maior concentração de etanol foi o 8, em que a concentração de substrato foi de 350 g/L e 14%, sendo estes, valores intermediários das faixas obtidas para concentração de substrato e celular pela análise conjunta dos efeitos combinados.

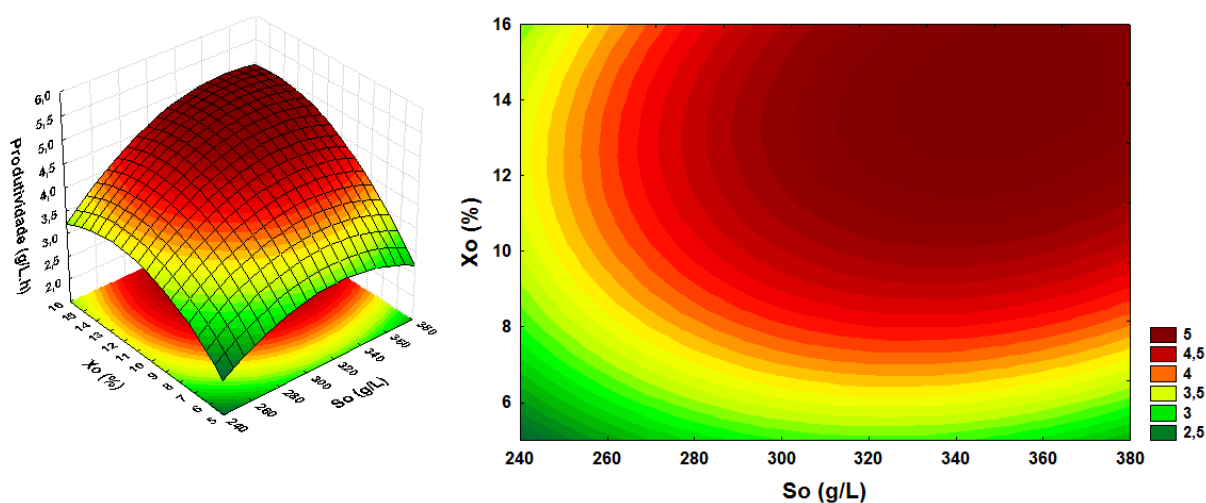
As Figuras 4.12, 4.13 e 4.14 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta produtividade em função de  $T$  e  $S_0$ ;  $T$  e  $X_0$ ; e  $S_0$  e  $X_0$ , respectivamente.



**Figura 4.12** – Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração de substrato e temperatura



**Figura 4.13** – Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular e temperatura



**Figura 4.14** – Superfície de resposta e curva de contorno para a produtividade em função da concentração celular e concentração de substrato

A resposta produtividade está diretamente ligada com a resposta concentração de etanol, sendo assim, as faixas de temperatura e concentrações de substrato e celular que maximizam essa resposta foram as mesmas obtidas para concentração de etanol.

Cruz et al. (2018) em seu experimento realizado com a cepa Y-904 a 26°C com 240 g/L de sacarose como substrato e 35 g/L de células adaptadas à temperatura de 4°C por duas vezes consecutivas, obteve rendimento de 93%, teor alcoólico de 14,4 % v/v e produtividade de 6 g/L.h em 19 horas de processo fermentativo.

O experimento deste trabalho que mais se aproxima ao realizado por Cruz e colaboradores (2018) foi o experimento 9 da Tabela 4.7, onde as condições foram 25°C a temperatura, 242,7 g/L concentração de substrato e 11% a concentração de células que equivale a aproximadamente 32 g/L. Os resultados obtidos foram bastante semelhantes em rendimento (92%) e teor alcoólico 14,4 % v/v, porém a produtividade foi de 3,8 g/L.h devido o tempo de fermentação ter sido de 30 horas.

Os possíveis motivos para essa diferença de produtividade se deve a utilização de caldo e melão de cana-de-açúcar neste trabalho e a adaptação da levedura a 4°C por Cruz et al. (2018) que ocasionou na redução do tempo de fermentação drasticamente.

O presente trabalho está focado na alta produção de etanol usando meios com alto teor de açúcar, o que leva a fermentações prolongadas, na faixa de 30 a 78 horas dependendo da temperatura, resultando consequentemente numa diminuição na produtividade do etanol.

Nota-se que para uma maior produtividade, se faz necessário maiores concentrações celular, o qual fica claro a influência da variável  $X_3$  como evidenciado tanto na Equação 4.2 quanto na Equação 4.1. Os maiores valores de produtividade obtidos neste DCCR foram os que utilizaram maiores concentrações de células, 14 e 16%, nos experimentos 8 e 14, detalhados na Tabela 4.7.

As equações (4.3) e (4.4), descrevem os modelos empíricos ajustados para o rendimento e concentração de açúcar residual, respectivamente, em relação às variáveis testadas. Para essas equações, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram ambos iguais a 0,92 e 0,91. Estes resultados indicam que 92 e 91% dos resultados experimentais se encaixam nos modelos apresentados nas Equações (4.3) e (4.4), respectivamente.

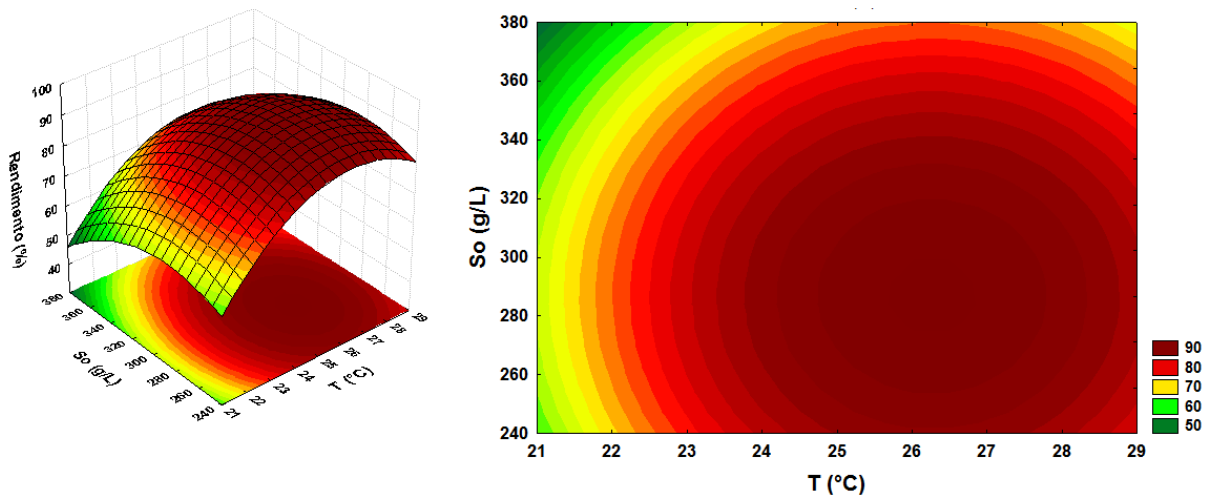
$$Y_{P/S} = 89,601 + 5,123X_1 - 4,033X_1^2 - 3,957X_2 - 3,400X_2^2 + 6,789X_3 - 4,207X_3^2 + 3,122X_1X_3 \quad (4.3)$$

$$C_{AR} = 18,873 - 23,222X_1 + 11,374X_1^2 + 23,690X_2 + 14,587X_2^2 - 22,763X_3 + 15,444X_3^2 - 12,000X_1X_3 \quad (4.4)$$

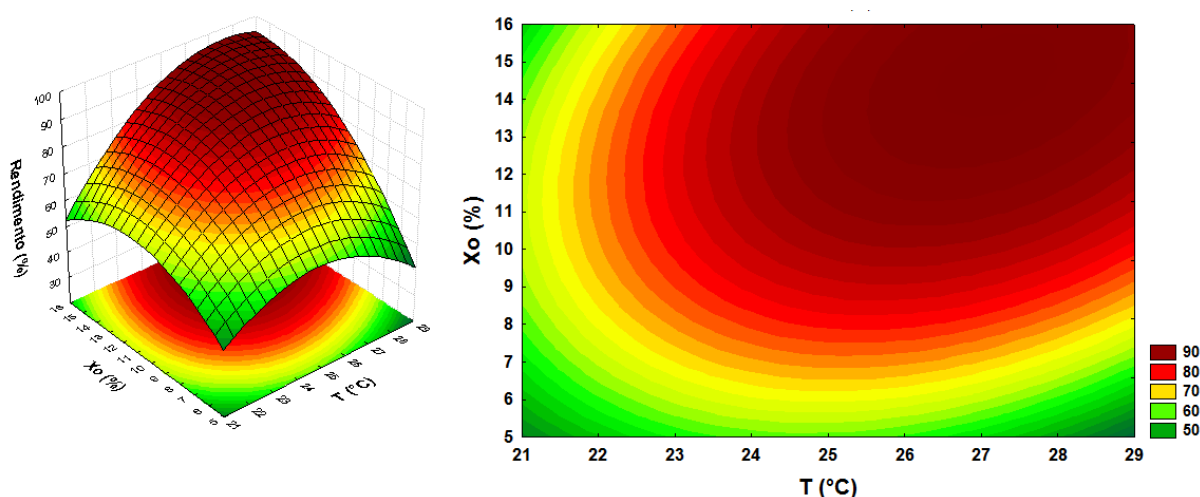
Analizando os coeficientes das variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  nas equações 4.3 e 4.4 verifica-se que para a resposta rendimento a variável com maior influência foi a concentração celular seguida pela temperatura e pela concentração de substrato. Sendo que as variáveis

concentração celular e temperatura influenciaram positivamente e a concentração de substrato negativamente. Como esperado, a variável que mais influenciou o aumento da concentração de açúcar residual foi a concentração de substrato. Já a temperatura e concentração celular influenciaram de forma positiva, ou seja, o aumento dessas variáveis, diminui o açúcar residual.

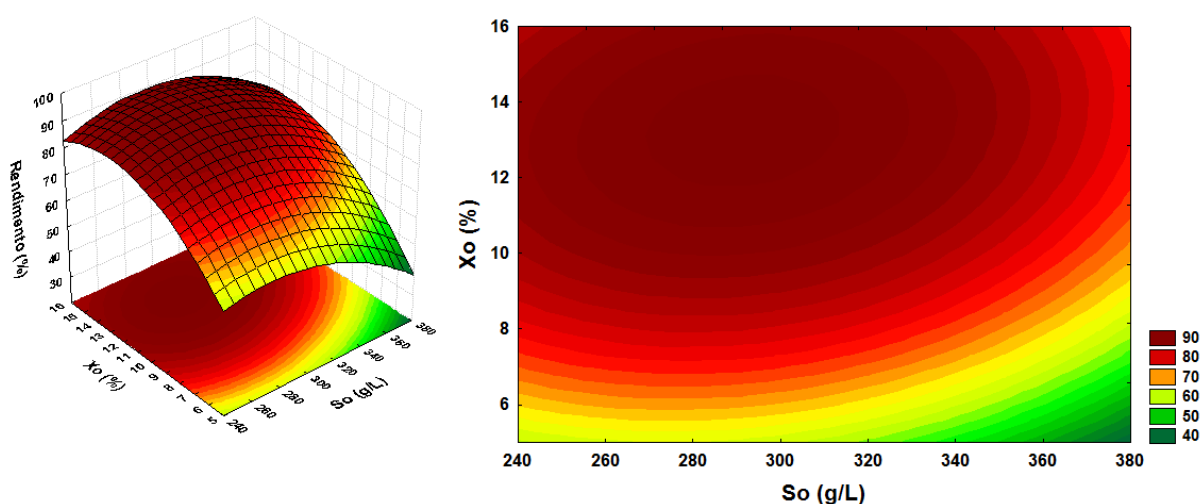
As Figuras 4.15, 4.16 e 4.17 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento em função de  $T$  e  $S_0$ ;  $T$  e  $X_0$ ; e  $S_0$  e  $X_0$ , respectivamente.



**Figura 4.15** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração de substrato e da temperatura



**Figura 4.16** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular e da temperatura



**Figura 4.17** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta rendimento em função da concentração celular e da concentração de substrato

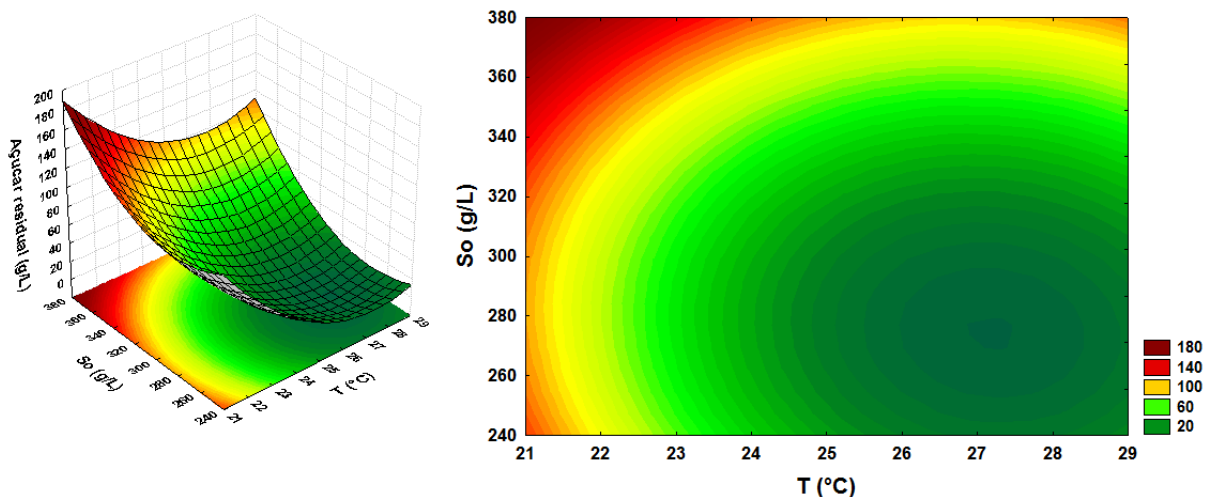
O sinal positivo dos coeficientes  $T$  e  $X_0$  na Equação 4.3 indica que maiores temperaturas e concentrações de células contribuem para um aumento do rendimento na produção de etanol. A Tabela 4.7 confirma a interpretação dada ao modelo, deixando evidente que maiores temperaturas ( $T$ ) e maiores concentrações celulares ( $X_0$ ) produzem maiores rendimentos, conforme se pode verificar pelos experimentos 1 e 4.

O efeito combinado da concentração de substrato e temperatura (Figura 4.15) indicam uma faixa de 240 a 320 g/L para concentração de substrato e de 24 a 28°C para a

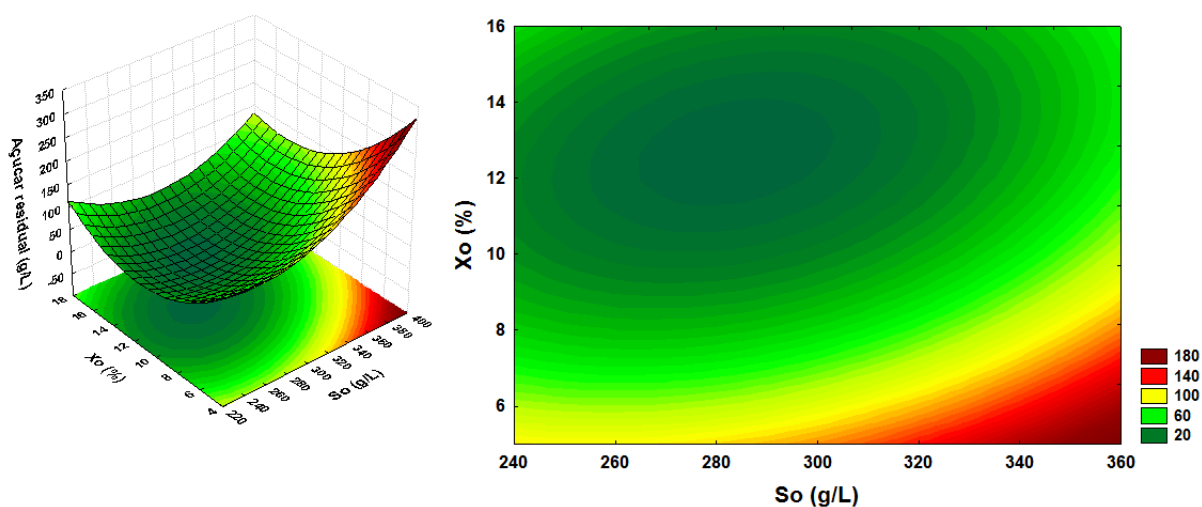
temperatura, que maximizam o rendimento. Na Figura 4.17, a faixa para concentração de substrato é de 260 a 320 g/L e na Figura 4.16 a faixa de temperatura está entre 25 a 29°C que maximiza essa mesma resposta. Portanto, a faixa de concentração de substrato que satisfaz ambos os efeitos combinados está entre 260 – 320 g/L, e a faixa de temperatura está entre 25 e 28°C.

Da mesma forma para a concentração celular, a partir das curvas de contorno das Figuras 4.16 e 4.17, definiu-se a faixa de concentração celular que maximiza o rendimento na região experimental trabalhada. A faixa aproximada de concentração celular correspondente ao máximo rendimento está entre 11 a 16%.

As Figuras 4.18, 4.19 e 4.20 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta açúcar residual em função de T e  $S_0$ ;  $S_0$  e  $X_0$ , e T e  $X_0$ , respectivamente.



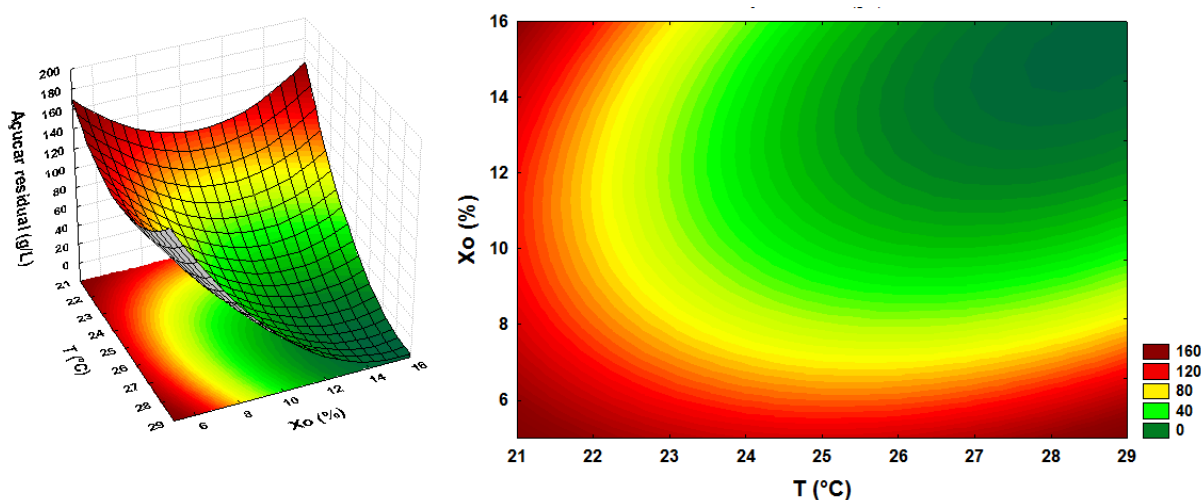
**Figura 4.18** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração de substrato e da temperatura



**Figura 4.19** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular e da concentração de substrato

A curva de contorno que representa o efeito da concentração de substrato em sinergismo com a temperatura (Figura 4.18) indica uma faixa aproximada da concentração de substrato de 240 a 300 g/L para a minimização da resposta concentração de açúcar residual. Já o efeito combinado da concentração de substrato e da concentração celular (Figura 4.19) indica uma faixa de 260 a 310 g/L dessa mesma variável. Portanto, a faixa de concentração de substrato que satisfaz ambos os efeitos combinados, para minimização da concentração de açúcar residual deve estar entre 260 e 300 g/L.

Observa-se que os experimentos em que se obteve maiores rendimentos próximos de 92% (Experimentos 4, 8, 9 e 14) foram aqueles em que o açúcar residual foi baixo e variou de 0,5 a 9,9 g/L.



**Figura 4.20** – Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta açúcar residual em função da concentração celular e da temperatura

Para a variável concentração de açúcar residual, maiores valores de temperatura e concentração celular levam a uma menor concentração de açúcar no final do processo de fermentação conforme pode ser verificado pelos experimentos 1 e 3; 5 e 7 da Tabela 4.7, concordando com os resultados para a variável rendimento em que uma menor concentração de substrato corresponde a um maior rendimento.

A concentração de açúcar residual diminui consideravelmente ao aumentar a temperatura de fermentação, como observado nos experimentos 2 e 4 em que o aumento de temperatura de 23 para 27°C reduz o açúcar residual de 64,3 para 5,8 g/L e aumenta o rendimento de 76,1 para 92,8%. O mesmo acontece nos experimentos 1 e 3, porém, a redução foi menor devido a concentração de células ter sido mais baixa.

O sinal negativo na Equação 4.4 para temperatura e concentração celular indica que maiores temperaturas e concentrações de células contribuem para uma diminuição do açúcar residual na produção de etanol.

O efeito combinado da concentração celular e da temperatura (Figura 4.20), indica que a faixa de concentração celular deve ser igual a 13 e 16% e a temperatura esta entre 27°C e o limite de temperatura estudada, 28,3°C, para que a concentração residual de açúcares seja o mais próximo de zero.

Fazendo essa mesma análise nas Figuras 4.18 e 4.19 para encontrarmos a faixa de temperatura e concentração celular que minimize o açúcar residual na fermentação, obteve-se a faixa de 26 a 29°C para temperatura e de 11 a 15% para concentração celular.

Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para minimização do açúcar residual a faixa da temperatura está entre 26 e 29°C e a da concentração celular entre 13 e 15%.

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno, concluiu-se que para maximizarmos as respostas estudadas rendimento, concentração de etanol e produtividade e minimizarmos a concentração de açúcar residual, a concentração celular deve ser alta para atender a todas as respostas, estando assim entre 13 e 15%. A temperatura que otimiza a resposta rendimento deve estar entre 25 e 28°C, mesma faixa que garante uma produtividade máxima e o mínimo de açúcar residual. A mesma análise foi feita para concentração de substrato, a faixa que maximizou a produtividade e concentração de etanol foi de 300 g/L até o limite estudado de 377,3 g/L, a faixa que maximizou o rendimento ficou entre 260 e 320 g/L e finalmente a faixa que minimizou a concentração de açúcar residual ficou entre 260 e 300 g/L. Sendo assim a concentração de substrato obtida que satisfaz simultaneamente a todas as respostas estudadas foi de 300 g/L.

Para validar o modelo para a concentração de etanol, produtividade, concentração de açúcar residual e rendimento, os valores ótimos de temperatura, concentração de substrato e de células foram calculados aplicando o algoritmo gerado usando Software *Maple 9.5*. otimização do ponto ótimo, que maximiza as respostas concentração de etanol, produtividade e rendimento e minimiza açúcar residual, estão apresentados na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8 – Otimização do ponto ótimo**

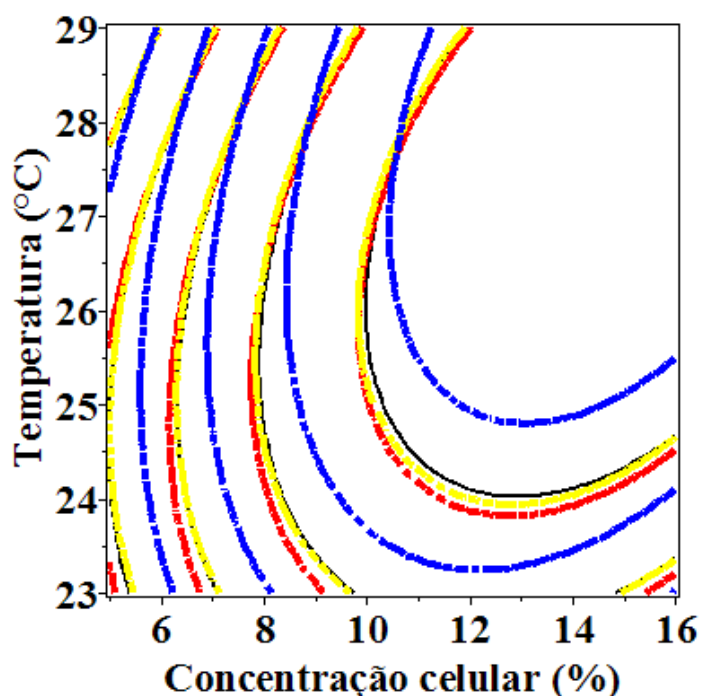
	Temperatura (°C)	Concentração de células (%)	Concentração de substrato (g/L)
<b>Concentração de etanol (g/L)</b>	28	14,5	359,7
<b>Produtividade (g/L.h)</b>	28	14,5	359,7
<b>Rendimento (%)</b>	27,2	14,5	273,6
<b>Açúcar residual (g/L)</b>	28,5	14,8	286,6

As melhores condições para a maximização da concentração de etanol e produtividade ocorreram nas seguintes condições de operação: temperatura = 28°C, concentração de substrato = 359,7 g/L e concentração celular = 16 %. Para a resposta rendimento, as condições para maximização foram: temperatura = 27,2°C, concentração de substrato = 273,6 g/L e concentração celular = 14,5 %. Já as melhores condições para

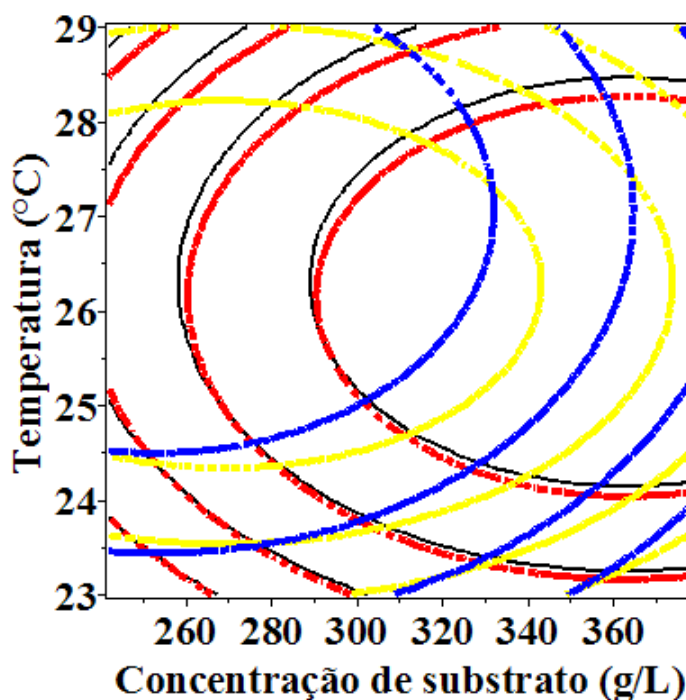
minimização da concentração de açúcar residual no final da fermentação foram: temperatura = 28,5°C, concentração de substrato = 286,6 g/L e concentração celular = 14,8 %.

O ponto ótimo gerado para definição da validação, foram diferentes para as quatro respostas estudadas, portanto, foi feito a seleção de um ponto dentro das faixas obtidas pela análise estatística.

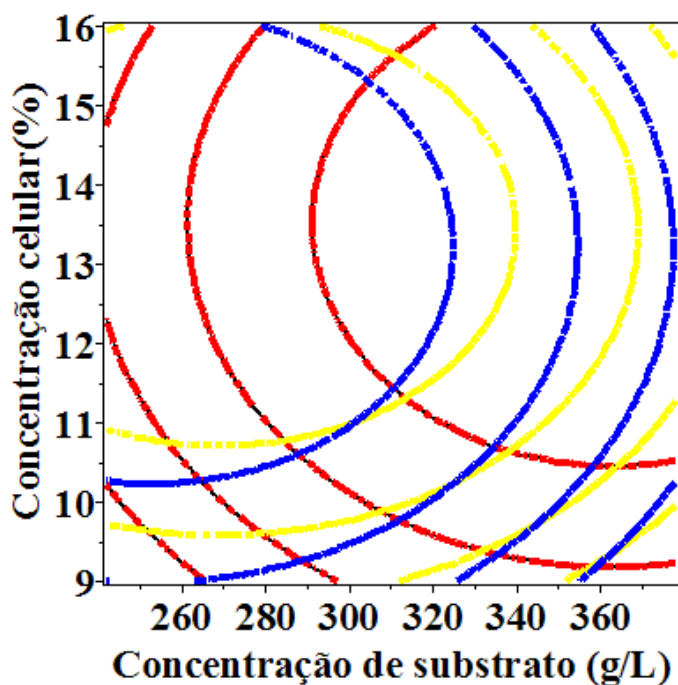
Visando uma maior confiabilidade das faixas obtidas foi realizado um estudo estatístico utilizando o software *Maple Release 9.5* em que serão apresentadas as três variáveis de processo estudadas graficamente duas a duas junto a todas as respostas avaliadas como mostram as Figuras 4.21, 4.22 e 4.23.



**Figura 4.21** – Temperatura (° C) versus Concentração celular (%) da região ótima para as respostas Concentração de etanol —, Produtividade —, Rendimento — e Açúcar residual —



**Figura 4.22** – Temperatura (° C) *versus* Concentração de substrato (g/L) da região ótima para as respostas Concentração de etanol —, Produtividade —, Rendimento — e Açúcar residual —



**Figura 4.23** – Concentração celular (%) *versus* Concentração de substrato (g/L) da região ótima para as respostas Concentração de etanol —, Produtividade —, Rendimento — e Açúcar residual —

Pela análise das curvas, concluiu-se que para maximizarmos as respostas estudadas rendimento e produtividade e minimizarmos a concentração de açúcar residual, a faixa de temperatura está entre 25,5 e 27°C, a concentração celular entre 12 e 15% e a concentração de substrato entre 300 e 320 g/L.

Como a concentração celular não é um entrave econômico para uma fermentação alcoólica, optou-se por trabalhar com o limite superior de ambas as faixas obtidas nos softwares *Statistica* e *Maple Release*, que foi de 15% de células na tentativa de maximizar as respostas rendimento e produtividade e minimizar a concentração de açúcar residual.

Fazendo essa mesma análise para concentração de substrato, a concentração de 300 g/L é a que atende ambas as faixas obtidas nos softwares.

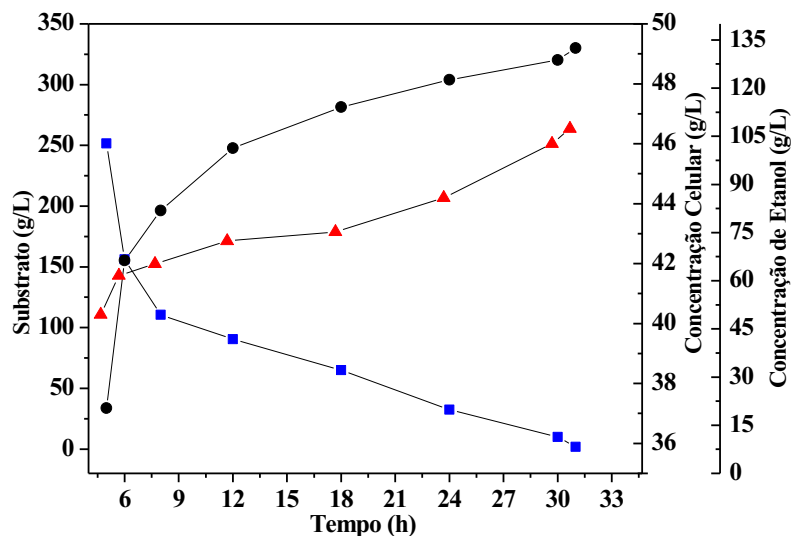
A temperatura que atende tanto a faixa obtida pelas curvas de contorno do *software Statistica* e do *Maple Release* foi a temperatura de 27°C. Essa também é a temperatura intermediária que resultou em altos valores de teor alcoólico obtido com a estirpe Y-904 trabalhando com processos sucessivos de fermentação em batelada repetida.

Portanto, as condições para realização dos experimentos para validação foram definidas baseando-se nas faixas de interesse, para as respostas avaliadas na literatura (CRUZ et al., 2018) e considerando-se os critérios técnicos e econômicos. Pela análise das curvas de contorno, definiu-se como condição a ser reproduzida experimentalmente: concentração celular 15% v/v, concentração de substrato de 300 g/L e temperatura de 27°C.

#### 4.3.3 Experimento de validação

O principal objetivo desta etapa foi verificar se empregando o ponto escolhido dentro da faixa indicada pela análise das superfícies de resposta do delineamento composto central, para as variáveis estudadas, as respostas obtidas seriam satisfatórias.

Na Figura 4.24 pode-se observar os perfis de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular em função do tempo, após o tempo de enchimento do reator (5 horas), para a condição máxima obtida pela análise das superfícies de resposta (15% v/v de células, concentração de substrato de 300 g/L e temperatura de 27°C). Obteve-se no tempo final de fermentação de 31 horas um rendimento de 90%, produtividade de 4,42 g<sub>etanol</sub>/L.h, teor alcoólico de 16,8°GL, com o consumo total de todo o substrato, como apresentado na Tabela 4.7.



**Figura 4.24** – Perfis de concentração de etanol —●—, concentração celular —▲— e substrato —■— em função do tempo para o experimento de validação

Obtendo as equações em termos das variáveis não codificadas e substituindo os valores de temperatura, concentração de substrato e celular (27°C, 300 g/L e 15% ) obtidos no DCCR para o ponto de validação, obtem-se os valores preditos pelo modelo de acordo com a Tabela 4.9.

**Tabela 4.9** – Validação do ponto obtido no DCCR

	Modelo	Experimental	Erro (%)
<b>Concentração de etanol (g/L)</b>	146,7	135	7,97
<b>Produtividade (g/L.h)</b>	4,86	4,42	9,05
<b>Rendimento (%)</b>	92,3	90	2,49
<b>Açúcar residual (g/L)</b>	0	0	0

Estes resultados mostram que as equações de otimização fornecidas pelo delineamento composto central conseguiram descrever bem o comportamento do processo de fermentação, indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, validando-o desta forma com erro de até 9,05%.

#### 4.4 FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA REPETIDA COM ESTIRPE FLOCULANTE FL-20

O procedimento de realização deste experimento está descrito no subitem 3.2.1 desta tese. As fermentações foram realizadas a 30°C com meio otimizado por Pereira et al., (2010), contendo concentração de 300 g/L de glicose.

O tempo de fermentação definido de 47 horas, foi baseado nos resultados obtidos por Gomes et al., (2012), utilizando a mesma estirpe.

O desempenho da linhagem recombinante FL-20 ao longo de 8 ciclos está resumido na Tabela 4.10 e os perfis de concentração de etanol, glicose residual e viabilidade são apresentados na Figura 4.25.

**Tabela 4.10** - Parâmetros cinéticos de fermentação da estirpe floculante FL-20 em um sistema de repetição de lotes realizado em frascos agitados durante 8 ciclos.

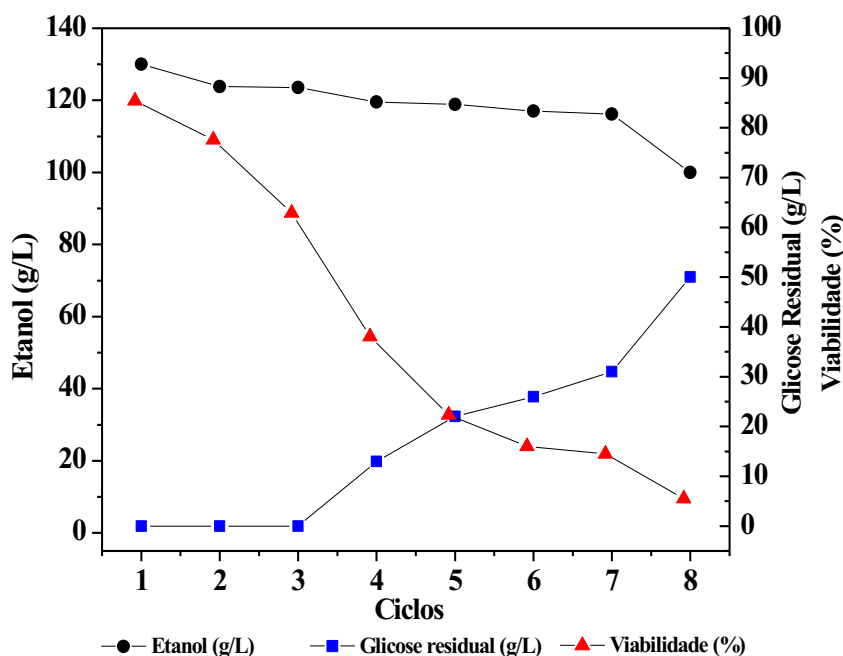
Ciclo	Tempo de fermentação (h)	Concentração de etanol (g/L)	Teor Alcoólico % (v/v)	Glicose Residual (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Viabilidade Final (%)	Rendimento (%)
1	47	130,0	16,5	0	2,77	86,1	85,7
2	47	123,8	15,7	0	2,63	78,0	81,6
3	47	123,6	15,7	0	2,63	65,3	81,4
4	47	119,5	15,1	13,3	2,54	41,3	78,8
5	47	118,8	15,0	22,4	2,53	26,2	78,3
6	47	117,1	14,8	26,8	2,49	20,1	77,1
7	47	118,2	15,0	33,6	2,51	18,4	77,9
8	47	101,4	12,8	51,4	2,16	10,5	66,8

Os valores de etanol obtidos ao longo dos ciclos sugerem uma eficiência e cinética de fermentação similar durante os primeiros 3 ciclos. No 4º ciclo, uma redução na taxa do consumo de glicose foi observada. Uma possível explicação pode ser a viabilidade reduzida das células, significando menos células fermentando. A partir do 4º ciclo a glicose não foi totalmente consumida nas fermentações, gerando um residual de glicose (13 – 51 g/L).

A concentração final de etanol e a viabilidade obtidas nesta etapa do trabalho foram semelhantes àquelas obtidas com a estirpe PE-2 durante 15 ciclos de batelada com a levedura recuperada por centrifugação por Pereira et al. (2012).

No trabalho de Pereira e colaboradores (2012), nos primeiros cinco ciclos de fermentação, quase toda a glicose foi consumida (< 17 g/L), utilizando 343 g/L de glicose inicial, permitindo a produção de altos níveis de etanol de 17% v/v com rendimentos de etanol

de 78 - 82%. Além disso, a produtividade variou de 3,45 a 4,59 g/L.h e a viabilidade caiu de 89 para 23%.



**Figura 4.25** – Desempenho da cepa FL-20 em função de 8 ciclos fermentativo.

No presente trabalho o residual de açúcar foi de aproximadamente 13 e 22 g/L no 4º e 5º ciclo respectivamente, a concentração máxima obtida de 16% v/v com rendimentos de etanol de 78 - 85,7%, produtividade de  $2,6 \pm 0,1$  g/L.h e viabilidade caindo de 86 para 26% ao longo dos 5 primeiros ciclos.

Gomes et al. (2012), utilizando a mesma estirpe em fermentações durante 5 ciclos de bateladas repetidas, obteve também resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Em 47 horas de fermentação para cada ciclo, a produtividade variou de 3,2 a 2,2 g /L.h e a viabilidade caiu de 61 para 20%.

Utilizando a estirpe recombinante FL-20, em batelada repetida o sistema de produção de etanol foi simplificado devido à habilidade de floculação das células, eliminando assim a etapa de centrifugação, consequentemente reduzindo os custos, como o de consumo de energia.

Além disso, as populações de leveduras podem se tornar mais robustas em tal tipo de operação quando comparado a um sistema com único ciclo, pois o inóculo já está fisiologicamente adaptado, do ciclo anterior, ao ambiente de estresse da fermentação. De

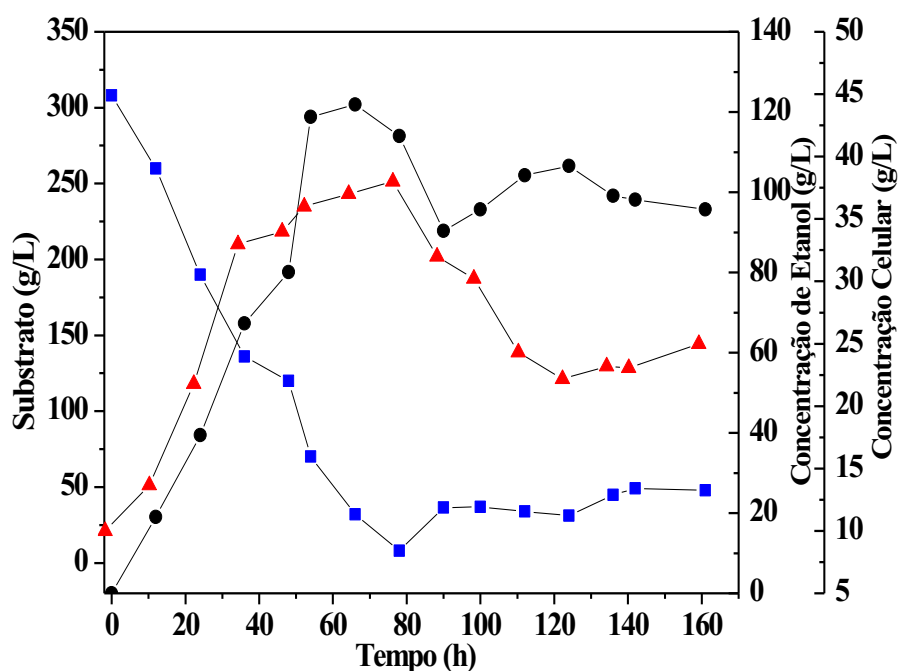
maneira natural, as células com maior tolerância ao estresse serão aquelas que originarão novas células, de um ciclo a outro.

Li et al. (2009), realizaram fermentações em batelada repetida utilizando uma cepa industrial auto-floculante desenvolvida para a produção de etanol combustível a partir de fermentações VHG. Os flocos de levedura eram recuperados por sedimentação no final da fermentação anterior e reutilizados no ciclo seguinte, a alta concentração de células de levedura foi mantida dentro do sistema de fermentação. Foram realizados 10 ciclos consecutivos de fermentação, a 30°C com concentração de glicose de 255 g/L. Obteve-se uma concentração média de 120 g/L de etanol com tempos curtos de fermentação variando de 8 a 14 horas nos ciclos. A viabilidade variou de 97,86% no primeiro ciclo a 78,35% no último.

Os resultados de Li e colaboradores (2009), foram superiores aos obtidos nesta tese, tanto em termos de rendimento em relação ao teórico que ficou em torno de 92%, e a média obtida neste trabalho em torno de 78%, quanto na viabilidade final do último ciclo que foi de 78,35%, e a obtida neste trabalho de 10,5% . Além do tempo dos ciclos terem sido em média 5 vezes menor que os tempos de realização dos ciclos desta tese.

#### **4.5 FERMENTAÇÃO VHG EM REATOR AIR-LIFT COM FL-20**

Perfis de consumo de glicose, produção de etanol e concentração celular são apresentados na Figura 4.26. Inicialmente o reator foi operado em batelada (68 horas), quando o açúcar residual ficou próximo de zero, e posteriormente em contínuo.



**Figura 4.26** – Perfis de concentração de etanol —●—, concentração celular —▲— e glicose residual —■— em função do tempo de operação no air-lift

A máxima concentração de etanol obtida foi de 123 g/L quando o reator ainda estava trabalhando em batelada. Observou-se que uma máxima concentração de células, 38 g/L, foi alcançada em torno de 68 horas de fermentação, correspondente a fase final do reator operando em batelada. Nos experimentos realizados em batelada alimentada com a estirpe FL-20, nos três primeiros ciclos em que toda a glicose foi consumida, obteve-se concentração de etanol de 130 e 123 g/L, valor semelhante ao obtido no reator air-lift quando operado em batelada.

A concentração celular quando o reator opera em contínuo foi consideravelmente menor (entre 23 e 33 g/L) comparativamente a primeira fase em batelada, que poderia ser causada por um maior crescimento celular que ocorre na primeira fase, uma relação já relatada por Devantier et al. (2005). Outra explicação pode ser o fato de que as células no início da fermentação vieram de um pré-crescimento (inóculo), sendo coletadas no início do período estacionário, final da fase de crescimento, o ponto onde os compostos de armazenamento são máximos.

A produção contínua de etanol por *S. cerevisiae* sob condições VHG já foi relatada por Bai et al. (2004b). O meio VHG continha 280 g/L de glicose (complementado com 5 g/L

de extrato de levedura e 3 g/L de peptona) alimentado a uma taxa de diluição de  $0,012 \text{ h}^{-1}$  (para garantir mais de 90% de conversão de glicose) os autores alcançaram concentrações médias de etanol de 15,8 % v/v durante 2 meses de operação com temperatura constante de  $30^{\circ}\text{C}$ . Foi observado oscilações de glicose residual, etanol e biomassa durante a fermentação contínua.

Pacheco (2010), utilizando um reator tipo torre com escoamento ascendente e recirculação externa concluiu que a concentração celular no inóculo foi a variável que mais afetou as respostas rendimento e produtividade. Um aumento na concentração celular no inóculo provocam um aumento no rendimento e na produtividade, e diminui os níveis residuais de sacarose.

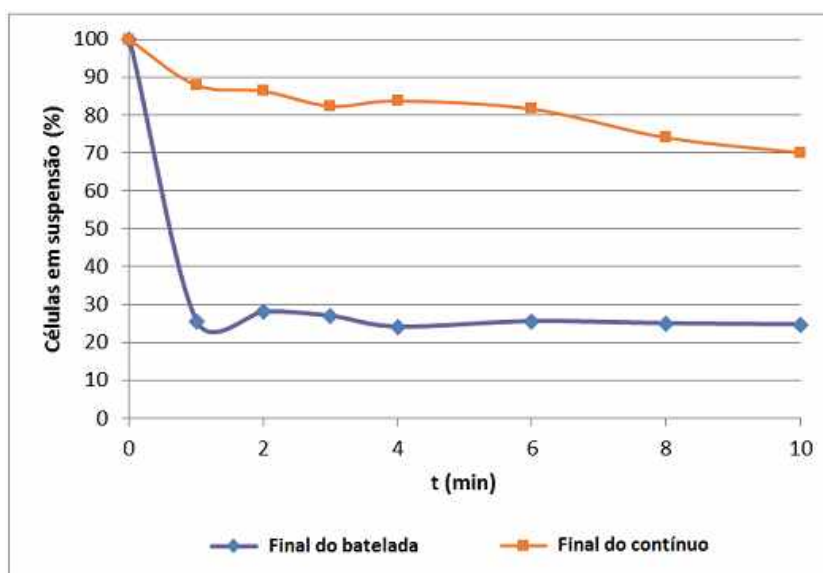
Os dados experimentais obtidos nesta etapa desta tese, demonstraram claramente que as concentrações de glicose residual, etanol e biomassa variaram. Essas variáveis do processo não puderam ser mantidas em seus estados estacionários, embora os parâmetros operacionais, incluindo a taxa de diluição e composição do meio, temperatura e valores de pH, foram precisamente controlados para ser estável. Para o reator air-lift, operando em contínuo, as variações de glicose residual, etanol e biomassa estavam entre 8 e 49 g/L, 90 e 114 g/L e 22 a 38g de massa seca, respectivamente. Nota-se que não foi possível aumentar a concentração de células significativamente, logo o residual de glicose também foi alto. A produtividade alcançada utilizando a cepa FL-20 foi de 2,77 g/L.h para fermentações VHG em batelada repetida em frascos agitados e 1,9 g/L.h no reator air-lift.

Ghorbani et al. (2011), estudaram a produção contínua de etanol por levedura imobilizada em alginato de sódio. Os resultados indicaram que a imobilização de *S. cerevisiae* não pode ser realizada em altas concentrações de açúcar, além de não ter gerado alta produtividade de etanol durante a fermentação.

O sistema proposto por Santos et al. (2015) para a fermentação alcoólica com dois reatores torres ligados em série com recirculação de células e decantadores intermediários foi promissor, pois garantiu um bom funcionamento, permitiu que o primeiro reator fosse alimentado com altas concentrações de sacarose, que as células fluidizassem no segundo reator minimizando a perda de células. Além disso, o sistema alcançou alto rendimento (92%) e produtividade (12,11 g/L.h) na condição otimizada do sistema.

A Figura 4.27 mostra os perfis de sedimentação ao final da fermentação na fase batelada e em contínuo. Observa-se que as células perdem parte da sua capacidade de

floculação ao longo do tempo, mais evidente no final da fermentação em contínuo, em que aproximadamente 80% das células estão em suspensão, ou seja, apenas aproximadamente 20% das células ainda tem característica floculante.



**Figura 4.27** – Perfis de sedimentação da cepa floculante FL-20 ao final da fermentação na fase batelada e em contínuo no reator air-lift.

Considerando que a floculação foi concedida através da introdução de um plasmídeo na célula, é possível que este fenótipo poderia sofrer variações específicas causadas por uma perda parcial do plasmídeo.

A utilização do cobre é necessária para a retenção do plasmídeo na levedura, mas também pode ter um efeito negativo sobre a capacidade fermentativa das mesmas. Uma alternativa para reduzir a perda do plasmídeo seria aumentando o teor de cobre no meio que consequentemente, diminuiria as variações na floculação. O uso de uma concentração de  $\text{CuSO}_4$  0,62 mM permitiria melhoria na floculação sem efeitos no desempenho da fermentação (GOMES et al., 2012). Outra solução poderia ser a integração do gene no genoma da cepa PE-2.

---

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

Com relação aos experimentos em batelada repetida as cepas Y-904 e Ethanol Red apresentaram desempenho satisfatórios no processo de fermentação VHG. A produtividade e a viabilidade celular apresentaram comportamentos semelhantes para toda a faixa de temperatura estudada.

A cepa que apresentou melhor desempenho após 5 ciclos em termos de rendimento, produtividade e viabilidade foi a Ethanol Red, embora a Y-904 tenha apresentado um desempenho bastante semelhante.

A 27°C com a cepa Y-904 obteve-se a maior concentração de etanol em todos os ciclos estudados.

No DCCR a análise da influência das variáveis temperatura, concentração de ART e concentração celular em processo batelada alimentada com tempo de enchimento de 5 horas a análise em 30 horas de fermentação indicou uma faixa com melhores resultados de 25 – 28°C, 11 – 15% (v/v) concentração celular e 300-320 g/L de concentração de ART.

O modelo que melhor proporcionou a maximização das respostas indicou valores de produtividade de 4,86 g/L.h, rendimento de 92,3%, concentração de etanol de 146,7 g/L e açúcar residual de 0 g/L, utilizando temperatura de 27°C, concentração celular de 15% e concentração de substrato de 300 g/L.

O experimento de validação realizado na temperatura de 27°C, concentração celular de 15% e concentração de substrato de 300 g/L resultou em uma produtividade de 4,42 g/L.h, rendimento de 90%, concentração de etanol de 135 g/L e açúcar residual 0 g/L, com erro de 9,05, 2,49, 7,97 e 0 %, respectivamente.

A estirpe *S. cerevisiae* FL-20 modificada foi estudada em batelada repetida em 8 fermentações VHG consecutivas, com reciclo das células durante todo o processo. Obteve-se uma concentração média de etanol de 130 g/L, com uma produtividade final de 2,77 g /L .h. Entretanto, para sistema em contínuo, o estado estacionário para a taxa de diluição de 0,03h foi atingido com valores altos de glicose residual e concentração de etanol abaixo do esperado, além de verificar perda da capacidade de floculação da levedura.

A cepa Y-904 apresentou resultados excelentes em termos de rendimento e viabilidade celular em fermentações VHG em toda a faixa de temperatura estudada. Com essa

estirpe obteve-se bons resultados quando se utilizou mostos à base de misturas de melaço e caldo de cana, indicando assim a possibilidade de aplicação em situações industriais.

---

---

## **CAPÍTULO 6**

### **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

---

---

- Dar continuidade aos estudos empregando leveduras de características floculantes em air-lift em condições de VHG.
- Avaliar o desempenho da levedura floculante FL-20 em diferentes condições de temperatura.

---

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; BENBADIS, L.; BIDEAUX, C.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUET, S. E. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 537-542, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1393-5>

ALVES, D. M. G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. (Dissertação de Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1994.

ALVES, J. G. L. F. Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbio de *Saccharomyces cerevisiae*. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA, UNICAMP, 1996.

ALVES, P. R. L. Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo. (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba/SP, 2015.

AMORIM, H. V. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. Araras. Planalsucar. p. 95. 1977.

AMORIM, H. V.; GRYSCHKE, M.; LOPES, M. L. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane-fuel ethanol industry. In: Eggleston G, ed. Sustainability of the sugar and sugar ethanol industries. ACS symposium series. Washington: American Chemical Society. v. 1058 p.73–82, 2010. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1058.ch005>

AMORIM, H. V.; NETO, H. A.; LOPES, M. L.; TEIXEIRA, L.; GIOMETTI, F. M. O estado da arte e os gargalos. *Revista Opiniões*. v.45, p. 48-49, 2015.

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

ANDRADE, I.D. Monitorização de um Processo de Fermentação Alcoólica em Contínuo. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 104 p., 2000.

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C. ANDRIETTA, M. G. S.. study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. *Bioresource Technology*, v. 9, p. 3002-3008, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.037>

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. *Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Vol. 03. Edgard Blucher Ltda. São Paulo-SP, Brasil, 595p, 2001

ARSHAD, M.; HUSSAIN, T.; IQBAL, M.; ABBAS, M. Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant *S. cerevisiae*, *Braz. J. Microbiol.* v. 48, p. 403-409, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.003>

ATALA, D. I. P. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. (Tese de Doutorado). Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ATALA, D.I.P., COSTA, A.C., MACIEL, R., MAUGERI, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. *Appl. Biochem. BIOTECHNOL.* V.91-93, P.353–366, 2001. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:353>

AUESUKAREE, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* V.124, p.133–142, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>

BADINO, A. C.; BERNARDO, A.; CRUZ, A. J. G.; SONEGO, J. L. S.; RODRIGUES, K. C. S. Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO<sub>2</sub> stripping for bioethanol production. *Chemical Engineering Research and Design.* v. 132, p. 77–88, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.12.024>

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.Q.; TAN, T.W. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Prog. Energy Combust. Sci.* v. 47, p. 60–88, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>

BAFRNCOVA, P.; SMOGROVICOVA, D.; SLAVIKOVA, I.; PATKOVA, J.; DOMENY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 21, 337–341, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1005436816047>

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A. e MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v.26, n.1, p.89-105. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>

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 Bioeng.*v. 8, p.558–566, 2004a. <https://doi.org/10.1002/bit.20221>

BAI, F.W.; CHEN, L.J.; ZHANG, Z.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J Biotechnol.*v. 110, p. 287–293, 2004b. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.017>

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, v. 86 (11), p. 2273 – 2282, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>

BARBOSA, H. S. Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de Bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular. (Dissertação de Mestrado). UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara-SP, 2013.

BASSO, L. C.; PAULILLO, S. C. L. Estudo comparativo entre a levedura “turbo” e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. In: Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica: 2003. Piracicaba: Fermentec; FEALQ; ESALQ. P.12-25, 2003.

BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. *Biofuel production - Recent Developments and Prospects*, v. 1530, p. 85–100, 2011.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 8:1155–1163, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>

BERTRAND, E.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SIGOILLOT, J. C.; FAULDS, C. First generation bioethanol. In: Soccol CR, Brar SK, Faulds C, Ramos LP, eds. *Green fuels technology*. Switzerland: Springer International Publishing; 175–212, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_8)

BIRCH, R. M.; CIANI, M.; WALKER, G. M. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in wine yeast. *Journal of Wine Research*, London, v. 14, n.1, p. 3 -15, 2003. <https://doi.org/10.1080/0957126032000114973>

BRAUER, M. J.; SALDANHA, A. J.; DOLINSKI, K.; BOTSTEIN, D. N. Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Mol Biol Cell*. V.16, p. 2503–2517, 2005. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0968>

CANDIDO, L. Treinamento Fermentação/Destilação. Alvorada do Bebedouro S.A – Açúcar e Álcool, 2012. Disponível em < <https://pt.slideshare.net/leandrocandido982/5treinamento-fermentao-destilao>> Acesso em 13/09/2018.

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

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W. M. M. Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology* v. 13, p. 219–280, 1986. <https://doi.org/10.3109/10408418609108739>

CERQUEIRA, D. P. Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CERRI, M. O. Avaliação de transferência de calor e massa de um biorreator airlift de circulação interna de bancada para a produção de ácido clavulânico. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos–SP, 2005.

CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: characteristics, applications and design considerations. *Chemical Engineering Communications*, v. 60, p. 195-242, 1987. <https://doi.org/10.1080/00986448708912017>

CHISTI, M.Y. Air-Lift Bioreactors, Elsevier, New York, 1989.

CHOI, G. W.; UMB, H. J.; KANG, H. W.; KIM, Y.; KIM, M.; KIM, Y. H. Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. Biomass and Bioenergy, v. 34, p. 1232 – 1242, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.018>

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. ISSN 2318-7921 Acomp. safra bras. cana, Safra 2016/17, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, v. 3. p. 1-77, 2017.

COURCHESNE, W. E.; VLASEK, C.; KLUKOVICH, R.; COFFEE, S. Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology. v. 193, p. 323–334, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0673-6>

CRUZ, L. M.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Evaluation of process conditions in the performance of yeast on alcoholic fermentation. Chemical Engineering Communications, v. 205, N. 6, 846–855, 2018. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1423061>

CRUZ, M. L. Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica. (Dissertação de Mestrado), Programa de pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2015.

CTBE. Laboratório nacional de ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2014. Disponível em <<http://ctbe.cnpm.br/fermentacao-vhg-dobro-etanol-menos-vinhaca/>> Acesso em 16/08/2018.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. J Ind Microbiol. 7(3):191–195, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF01575882>

DEESUTH, A.; LAOPAIBOON, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effect of nutrient supplementation and aeration. Ind and Crop Prod, v.74, p. 95–102, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.068>

DEVANTIER, R.; SCHEITHAUER, B.; VILLAS-BOAS, S.G.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. Biotechnol. Bioeng. 90, 703–714, 2005. <https://doi.org/10.1002/bit.20457>

DIAS, M. O. S.; FILHO, R. M.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. Environmental Development, v. 15, p. 35-51, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>

DOMINGUES, L. M. A. R. Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológicas. (Tese Doutorado), Universidade do Minho, Portugal, 2001.

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles. London: Ed Academic Press Ltda, 439 p., 1997.

ELEUTHERIO, E. C. A.; RIBEIRO, M. J. S.; PEREIRA, M. D.; MAIA, F. M.; PANEK, A. D. Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, New York, v. 36, p. 1217-1223, 1995.

FERMENTEC. Fermentec News, 2015. Disponível em <<http://fermentecnews.com.br/2015/09/09/o-estado-da-arte-e-os-gargalos/>> Acesso em 18/09/2018.

FERMENTEC. Fermentec News, 2017. Disponível em <<http://fermentecnews.com.br/2017/08/>> Acesso em 18/09/2018.

FERMENTEC. Fermentec News, 2018. Disponível em <<http://fermentecnews.com.br/2018/01/18/caracteristicas-da-producao-de-etanol-no-brasil/>> Acesso em 18/09/2018.

FERNANDES, A. C. Cálculo na agroindústria da cana de açúcar. 2ªed. Piracicaba. STAB. p.240, 2003.

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, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciênc Tecnol Alim*.19(10):29–32, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611999000100008>

FINGUERUT, J. Produção de álcool: pesquisa e desenvolvimento. C. D. T. Copersucar. Curso Internacional “Energia na indústria de açúcar e álcool”, 2004.

FREITAS, J., WINTZ, H. J., KIM, H., POYNTON, H., FOX, T., VULPE, C. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *BioMetals*. v.16, p. 185–197, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1020771000746>

FUKUSHIMA, S.; YAMADE, K. A novel process of ethanol production accompanied by extraction of sugar in cane chips. *Journal of Fermentation Technology*, v. 66 n.4, p. 423-426, 1988. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(88\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0385-6380(88)90009-X)

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI, A. E.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, v.36, p.503–509, 2011.

GIBSON, B. R.; LAWRENCE, F. M.; LECLAIRE, J. P. R.; POWELL, C. D.; SMART, K. A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*. v. 31, p. 535-569, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *Int Sugar J*. v.110(1311), p 175–181, 2008.

- GOMES, D.G., GUIMARÃES, P. M. R., PEREIRA, F. B., TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, L. Plasmid-mediate transfer of FLO1 into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation–sedimentation. *Bioresource Technology* 108, 162–168, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.089>
- GOMEZ, P. A. A. Simulação de diferentes alternativas de arranjo de uma unidade de fermentação piloto móvel para a produção de etanol. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.
- GUERREIRO, M.A. Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1995.
- HENDLER, B. Construção de um Software de Simulação e Modelagem Para Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada, Considerando Diauxia Para a Glicose e a Frutose. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011.
- HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Ver.* Vol. 66, No. 2, p. 300-372, 2002. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002>
- HORAK, J. Yeast nutrient transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1331, p. 41-79, 1997. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002>
- HOUNSA, C. G.; BRANDT, E. V.; TREVELEIN, J.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*. Vol. 144, p. 671 -680, 1998. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-671>
- HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V.; LIMA, L.; MULDER, L.; GEURTS, W.; WALSH, M.; LONDESBOROUGH, J. Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. *Appl Environ Microbiol* 76:1563–1573, 2010. <https://doi.org/10.1128/AEM.03153-09>
- IBETO, C. N.; OFOEFULE, A. U.; AGBO, K. E. A Global Overview of Biomass Potentials for Bioethanol Production: A Renewable Alternative Fuel Trends in Applied Sciences Research, 2011. <https://doi.org/10.3923/tasr.2011.410.425>
- ISONO, Y.; HOSHINO, A. Production of ethanol using granulated yeast cells prepared by a spray dryer. *The Journal of general and Applied Microbiology*, v. 46, n.4, p. 231-234, 2000. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.231>
- JONES, A.M.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.60, p.1048–1051, 1994.
- 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.
- KASEMETS, K.; NISAMEDTINOV, I.; LAHT, T.M.; ABNER, K.; PAALME, T. Growth characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* S288C in changing environmental conditions:

auxoaccelerostat study. Antonie van Leeuwenhoek, v.92, no.1, p. 109-128, 2007. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.231>

KHONGSAY, N.; LAOPAIBOON, L.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Optimization of agitation and aeration for very high gravity ethanol fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* using an orthogonal array design. *Energies* v.5, p.561–576, 2012. <https://doi.org/10.3390/en5030561>

KIM, J. H.; RYU, J.; HUH, I. Y. Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17, *Bioprocess Biosyst. Eng.* v. 37, p. 1871–1878, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1161-1>

KUTYNA, D. R.; VARELA, C.; STANLEY, G. A.; BORNEMAN, A. R.; HENSCHKE, P. A.; CHAMBERS, P. J. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 93, p. 1175–1184, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3622-7>

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 83, p. 627-637, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1885-z>

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresour Technol.* v.100, p. 4176–82, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.046>

LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84(6), p. 1079–1086, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2043-3>

LIMA, U.A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos - Vol. 3 – Editora Edgard Blucher*, 2001.

LIN, Y.; CHIENB, W.; DUANB, K.; CHANG, P. R. Effect of aeration timing and interval during very-high-gravity ethanol fermentation. *Process Biochemistry*. v.46, p. 1025–1028, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2043-3>

LIN, Y.; ZHANG, W.; LI, C.; SAKAKIBARA, K.; TANAKA, S.; KONG, H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and bioenergy*. v 47, p. 395 – 401, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019>

LOPES, M.L.; PAULILLO, S. C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A. LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Braz J Microbiol.*47, 64-76, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>

LOUHICHI, B.; BELGAIB, J.; BENAMOR, H.; HAJJI, N. Production of bio-ethanol from three varieties of dates. *Renew Energ.* v. 51, p. 170-174, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.07.028>

- MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Berlin, v.87, n.3, p. 829 – 845, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2594-3>
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brook*, 10. ed. São Paulo, Brasil: Prentice Hall, 2004.
- MENEZES, T. J. B. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141 – 178, 1980.
- MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactor, air-lift reactors. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Editora John Wiley & Sons. 320 324,327,340-344, 1999.
- MIRA, N. P.; PALMA, M.; GUERREIRO, J. F.; SA-CORREIA, I. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microb Cell Fact*. 9:79, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-79>
- MIRANDA Jr, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Sucrose fermentation by brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen Sources. *Journal of the Institute of Brewing*. v.115, p.191 - 197, 2009. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00368.x>
- 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. <https://doi.org/10.11606/D.11.2007.tde-30102007-110646>
- MONTEIRO, B. M. S. Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar. Dissertação (Tese em ciência e tecnologia de alimentos) – Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, *Biotechnol. Adv.*, 28, 817–830, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway: Lehninger - Principles of Biochemistry*, 5a ed. W. H Freeman and Company, New York, 2008.
- NETO, A. E. Estado da arte da vinhaça. ÚNICA – União da Indústria de cana-de-açúcar. Piracicaba- SP, 2016.
- NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 37 (1), p. 52 – 68, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>

- NOVACANA. Produção de etanol: Tecnologia praticada no Brasil, 2018. Disponível em <<https://www.novacana.com/etanol/producao-tecnologia-praticada-no-brasil/>> Acesso em 16/08/2018.
- ONKEN, U.; WEILAND, P., Airlift Fermenters: Construction, Behavior, and Uses, Advanced Biotechnology Processes, p. 67-95, 1983.
- ONSOY, T.; THANONKEO, P.; THANONKEO, S.; YAMADA, M. Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. KMITL Science and Technology Journal, v. 7, p. 55-60, 2007.
- PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- PALUKURTY, M.A.; TELGANA, N.K.; BORA, H.S.R.; MULAMPAKA, S.N. Screening and optimization of metal ions to enhance ethanol production using statistical experimental designs. Afr. J. Microbiol. Res. 2, 87–94, 2008.
- PANEK, A. C.; MANSURE, J. J. A.; PASCHOALIN, M. F.; PANEK, D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperature shifts. Biochemie. v.72, p.77–79, 1990. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(90\)90176-H](https://doi.org/10.1016/0300-9084(90)90176-H)
- PATERNINA, L. M. C. Modelagem e simulação do processo de fermentação extrativa a vácuo com uma câmara de flash e separação do CO<sub>2</sub> utilizando uma coluna de absorção. Faculdade de Engenharia Química, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2011.
- PATRASCU, E.; RAPEANU, G.; HOPULELE, T. Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol. Innovative Romanian Food Biotechnol. v. 4, p.1–11, 2009.
- PAULILLO, S. C. L.; YOKOYA, F.; BASSO, L. C. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. Braz J Microbiol. v. 34(3), p. 249–254, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000300014>
- PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. Journal of Bioscience and Bioengineering v.112 (2), 130-136, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.022>
- PEREIRA, F.B.; GOMES, D. G.; GUIMARAES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. Biotechnol Lett., 34:45–53, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0735-0>
- PEREIRA, F.B.; GUIMARAES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. Bioresour Technol 101:7856–7863, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.082>

- PETROV, V. V.; OKOROKOV, L. A. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. *Yeast*, Chichester, v.6, n.4, p. 311 -318, 1990. <https://doi.org/10.1002/yea.320060404>
- PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.28 (1), p. 36-43, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.039>
- PHUKOETPHIM, N.; SALAKKAM, A.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.26, p. 84-92, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.005>
- PHUTELA, U. G.; KAUR, J. Process optimization for ethanol production from sweet sorghum juice using *Saccharomyces cerevisiae* strain NRRL Y-2034 by response surface methodology. *Sugar Tech.* v.16(4), p. 411–421, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0283-0>
- PIDDOCKE, M. P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H. P.; NIELSEN, K. F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.84, p. 453–464, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1930-y>
- PIPER, P. W.; TALREJA, K.; PANARETOU, B.; MORADAS-FERREIRA, P.; BYRNE, K.; PRAEKELT, U. M.; MEACOCK, P.; RÉCNACQ, M.; BOUCHERIE, H. Induction of major heat shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology, Reading*, v.140, n.11, p. 3031-3038, 1994. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-11-3031>
- PIRES, J. M. C. Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio.(Tese de Doutorado), Universidade de Évora, Portugal, 2017.
- PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Appl Environ Soil Sci*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/581984>
- QIU, Z.; JIANG, R. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. *Biotechnol. Biofuels* v.10, 125, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0806-0>
- RAMON-PORTUGAL, F.; SEILLER, I.; TAILLANDIER, P.; FAVAREL, J. L.; NEPVEU, F.; STREHAIANO, P. Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* v. 37, p. 235–240, 1999.

REDDY, L.V.A.; REDDY, O.V.S. Improvement of ethanol production in very high gravity fermentation by horse gram (*Dolichos biflorus*) flour supplementation. *Lett. Appl. Microbiol.* v.41, p. 440–444, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01767.x>

REDDY, L.V.A.; REDDY, O.V.S. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*: role of finger millet (*Eleusine coracana* L.) flour. *Process Biochem.* v.41, p.726–729, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.08.011>

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; DA SILVA, J. C. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Braz J Microbiol.* v. 44(4), p. 1121–1131, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020>

RIVERA, E.C.; COSTA, A.C.; ATALA, D.I.P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M.R.W.; MACIEL, R. F. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature, *Proc. Biochem.*41. 1682–1687, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.009>

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

SANTOS, L. D.; SOUSA, M. D. B.; GUIDINI, C. Z.; DE RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochem.*, v. 50, p. 1725–1729, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.020>

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

SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Edgar Blücher. v.2, p. 541, 2005.

SHINEPER, L.; DUEVEL, K.; BROACH, J. R. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, n. 6, p. 624-630, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.002>

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.

SILVA, F. A. L. Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada. (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010. <https://doi.org/10.5016/DT000611955>

SILVA, M. S.; BASSO, L. C. Efeito do cádmio sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. v.24(1), p. 16-22, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000100004>

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. J. Appl Microbiol. V. 110, p. 1- 18, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>

SOUZA, S. C. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. 2004. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantã/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, T. P. Análise poligênica de leveduras isoladas de destilaria de cachaça para fermentação de alta eficiência. (Tese de Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2014.

SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I. M.; VENKATESWAR RAO, L. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresour Technol. v. 72(1), p. 43–46, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)90097-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)90097-4)

SRIDEE, W.; LAOPAIBOON, L.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. The use of dried spent yeast as a low-cost nitrogen supplement in ethanol fermentation from sweet sorghum juice under very high gravity conditions. Electron. J. Biotechnol. 14,1–15, 2011.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS. P. J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, v.109, p. 13-24, 2010.

SZWARC, A. O impacto do uso do etanol na qualidade do ar das grandes cidades. In: CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana de açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Edgard Blucher, p. 185 – 193, 2010.

TECHAPARIN, A.; THANONKEO, P.; KLANRIT, P. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. Brazilian journal of Microbiology v.48, p. 461–475, 2017.

TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R.; AZEVEDO, J.; SOUSA, M.; SIL, C. Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 5, p. 197 – 203, 1995. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(95\)01227-A](https://doi.org/10.1016/0927-7765(95)01227-A)

TEIXEIRA, J.A.; FONSECA, M. M.; VICENTE, A. A. Geometrias e modos de operação. In: Reatores biológicos – Fundamentos e aplicações. LIDEL. Lisboa - Porto, cap.2, p.27-68, 2007.

TEIXEIRA, M. C.; MIRA, N. P.; SA-CORREIA, I. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Opin Biotechnol. v. 22(2), p.150-156, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.011>

TEIXEIRA, M. C.; RAPOSO, L. R.; MIRA, N. P.; LOURENÇO, A.B.; SÁ-CORREIA, I. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal

- tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol.* v. 75, p. 5761-5772, 2009. <https://doi.org/10.1128/AEM.00845-09>
- TEIXEIRA, M. C.; RAPOSO, L. R.; PALMA, M.; SA-CORREIA, I. Identification of genes required for maximal tolerance to high-glucose concentrations, as those present in industrial alcoholic fermentation media, through a chemogenomics approach. *OMICS.* v.14, p. 201-210, 2010. <https://doi.org/10.1089/omi.2009.0149>
- TER SCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; REAVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, v. 141, n. 5, p. 1101-1108, 1995. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-5-1101>
- THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; JONES, A. M.; INGLEDEW, W. M. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: effect of sugar concentration and fermentation temperature. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 43. p.211–226, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF02916454>
- TOFIGHI, A.; ASSADI, M. M.; ASADIRAD, M. H. A.; KARIZI, S. Z. Bio-ethanol production by a novel autochthonous thermo-tolerant yeast isolated from wastewater. *J Environ Health Sci Eng.* V. 12(107), p. 1–6, 2014. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-107>
- TOSETTO, G.S. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.
- TROFIMOVA Y., WALKER, G., RAPOPORT, A. Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration–rehydration. *FEMS Microbiology Letters.* v. 308. Issue 1. p. 55 – 61, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01989.x>
- UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar, 2018. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/setor-sucroenergetico/>>. Acesso em: 18/09/2018.
- VAN HOEK, P.; HULSTER, E.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnol Bioeng.* v.68, p.518–523, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000605\)68:5<517::AID-BIT5>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000605)68:5<517::AID-BIT5>3.0.CO;2-O)
- VAN UDEN, N. Effect of alcohols on the temperature relations of growth and death I yeasts. Alcohol toxicity in yeast and bacteria. Boca Raton: CRC Press, p. 77-88, 1989.
- VILLEN, R. A.; BORZANI, W.; NETTO, A. S. Influence of the accumulation of phosphate and magnesium ions in the yeast cells on the ethanol productivity in batch ethanol fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 1, p. 153-155. 2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100020>
- VITOR, T. M. S. Fermentações em mostos com altos teores de açúcar. (Tese de Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

WANG, F.Q.; GAO, C.J.; YANG, C.Y.; XU, P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol. Lett.* v. 29, p. 233–236, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9220-6>

WANG, S.; THOMAS, K. C.; SOSULSKI, K.; INGLEDEW, W. M. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process Biochem.* v. 34, p. 421–428, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00097-1)

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* v.17, p.482–487, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01384-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01384-0)

XUE, C.; ZHAO, X.Q.; YUAN, W. J.; BAI, F. W. Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.24, p. 2257–2261, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9739-x>

YOU, K.M.; ROSENFELD, C.L.; KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 69, p. 1499–1503, 2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003>

ZABED, H.; FARUQ, G.; NARAYAN SAHU, J.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; BOYCE, A. N. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal.* p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/957102>

ZHANG, L.; ZHAO, H.; GAN, M.; JIN, Y.; GAO, X.; CHEN, Q.; GUAN, J.; WANG, Z. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology* v.102, p. 4573–4579, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.115>

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. *Biotechnology Advances.* New York, v.27, p. 849 – 856, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.006>

ZHAO, X. Q.; BAI, F.W. Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. *Journal of Biotechnology* v. 158, p. 176–183 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.038>

---

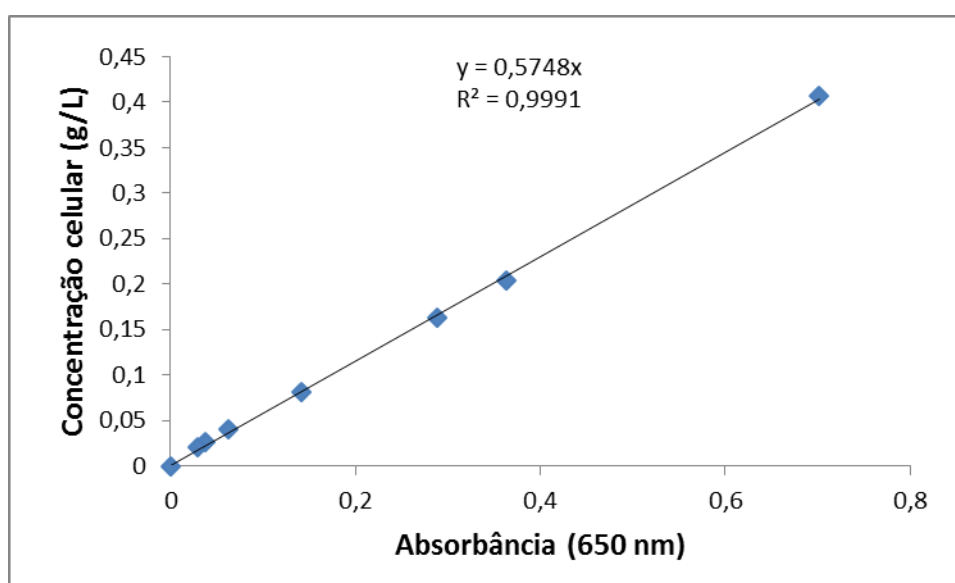
## APÊNDICE

---

### APÊNDICE A

#### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

O gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.



## APÊNDICE B

### DETERMINAÇÃO DA % VOLUME/VOLUME DE CÉLULAS

O gráfico e a equação da curva padrão obtida são apresentados abaixo.

