



Universidade Federal de Uberlândia  
Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos



**PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-  
AÇÚCAR POR *Saccharomyces cerevisiae* DE CARACTERÍSTICAS  
FLOCULANTES**

**Cristiane Vieira Camargos**

Patos de Minas - MG

2019



Universidade Federal de Uberlândia  
Faculdade de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos



**PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-  
AÇÚCAR POR *Saccharomyces cerevisiae* DE CARACTERÍSTICAS  
FLOCULANTES**

Cristiane Vieira Camargos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Dr. Líbia Diniz Santos

Coorientador: Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

Patos de Minas - MG

2019

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

---

C172p  
2019 Camargos, Cristiane Vieira, 1994-  
Produção de etanol utilizando melaço de cana-de-açúcar por  
Saccharomyces cerevisiae de características floculantes [recurso  
eletrônico] / Cristiane Vieira Camargos. - 2019.

Orientadora: Líbia Diniz Santos.

Coorientador: Eloízio Júlio Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.37>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Alimentos - Indústria. 2. Bioetanol. 3. Análise por injeção em  
batelada. 4. Saccharomyces cerevisiae. 5. Fermentação. 6. Levedos.  
I. Santos, Líbia Diniz, 1978-, (Orient.). II. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1952,  
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

---

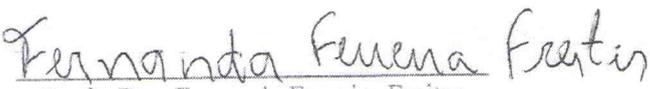
CDU: 664

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CRISTIANE VIEIRA CAMARGOS, SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, EM  
22 DE MAIO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:

  
Prof. Dr. Libia Diniz Santos  
Orientador – PPGEA/UFU

  
Prof. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro  
Co-orientador – PPGEQ/UFU

  
Profa. Dra. Fernanda Ferreira Freitas  
UFG-GO

  
Profa. Dra. Carla Zanella Gujdini  
PPGEA/UFU

  
Profa. Dra. Liliane Maciel de Oliveira  
FEQUI/UFU

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me proporcionado mais uma oportunidade de crescimento e aprendizado, pela força e seu amparo para enfrentar os desafios desta caminhada.

Aos meus pais, Marília e Agnaldo, que me acompanharam em todos os momentos com tanto amor, por me guiar, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e ensinamentos.

Às minhas queridas irmãs Mariane, Jessy e Geisse e sobrinha Melina por sempre me alegrarem nos momentos mais difíceis e pelo carinho.

À minha Vovó Margarida pelas orações, perseverança e conselhos.

À minha querida orientadora Líbia os maiores e mais sinceros agradecimentos. Obrigada por partilhar conhecimentos, pelo convívio, amizade e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pela excelente orientação no projeto desenvolvido. Aos professores Eloízio, Carla e Liliane agradeço imensamente pela disponibilidade e colaboração no desenvolvimento de algumas etapas do trabalho.

Aos meus amigos e colegas por ter tornado esta etapa da minha vida mais divertida e leve.

À Vitória, Júlia, Camila e Felipe pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos funcionários dos laboratórios de engenharia de alimentos e biotecnologia, em especial a Betânia, pela prontidão e disponibilidade em ajudar-me, pelo auxílio e colaboração no desenvolvimento dos experimentos.

À Universidade Federal de Uberlândia – *Campus* Patos de Minas pela oportunidade de realização deste mestrado.

À Capes e à Fapemig pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e com o apoio da Fapemig, projeto Demanda Universal APQ-02079-16.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste trabalho.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Marthin Luther King

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTAS DE SÍMBOLOS .....	iv
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Biocombustíveis .....	5
3.2 Etanol de primeira geração .....	6
3.3 Fermentação alcoólica .....	7
3.3.1 Processo em batelada.....	9
3.3.2 Processo em batelada alimentada .....	10
3.3.3 Processo contínuo .....	11
3.4 Fermentação sob altas concentrações de açúcares .....	13
3.5 Melaço de cana-de-açúcar .....	16
3.6 Leveduras floculantes .....	17
3.7 Cinética da fermentação alcoólica.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 Material.....	23
4.1.1 Microrganismo e meio de cultura.....	23
4.1.2 Unidade experimental.....	24
4.1.3 Preparo do inóculo.....	25
4.2 Metodologias .....	26

4.2.1	Métodos analíticos.....	26
4.2.1.1	Caracterização do melaço de cana-de-açúcar.....	26
4.2.1.2	Análise das concentrações de açúcares e álcool por cromatografia líquida de alta eficiência.....	26
4.2.1.3	Concentração e viabilidade celular de leveduras .....	27
4.2.2	Metodologia experimental.....	28
4.2.2.1	Seleção da levedura.....	28
4.2.2.1.1	Capacidade fermentativa.....	28
4.2.2.1.2	Capacidade de floculação .....	31
4.2.2.2	Tempo de geração .....	31
4.2.2.3	Fermentação em batelada com meio à base de melaço com e sem adição de nutrientes .....	32
4.2.2.4	Fermentação em batelada alimentada utilizando melaço de cana-de-açúcar .. .....	33
4.2.2.4.1	Estudo da aeração em fermentação NG com melaço e levedura floculante .....	33
4.2.2.4.2	Análise das fermentações HG e VHG utilizando melaço com leveduras floculantes .....	34
4.2.2.5	Estudo da produção máxima de etanol na fermentação alcoólica ( $P'_{máx}$ )...35	
4.2.2.6	Cinética da fermentação alcoólica em batelada alimentada.....	35
4.2.2.6.1	Modelagem matemática da batelada alimentada .....	35
4.2.2.6.2	Ajuste matemático dos parâmetros cinéticos.....	37
4.2.3	Cálculo de rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica ...	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
5.1	Seleção da Levedura.....	40
5.1.1	Capacidade Fermentativa .....	41
5.1.2	Capacidade de floculação .....	42
5.2	Tempo de geração.....	43

5.3	Caracterização do Melaço .....	44
5.4	Fermentação em batelada com meio à base de melaço com ou sem adição de nutrientes.....	47
5.5	Fermentações em batelada alimentada utilizando melaço de cana-de-açúcar com leveduras floculantes.....	50
5.5.1	Estudo da aeração .....	50
5.5.2	Estudo da concentração de ART em bateladas alimentadas em HG e VHG .....	55
5.6	Produção máxima de etanol.....	67
5.7	Cinética da fermentação alcoólica.....	68
6	CONCLUSÃO .....	72
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	73
	REFERÊNCIAS .....	74

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - (A) Consumo de energia nos transportes; (B) Consumo final de energia por fonte; (C) Oferta interna de energia.....	2
Figura 3.1 - Diagrama do processo de fermentação alcoólica com reciclo de células.....	9
Figura 3.2- Mecanismo da teoria da lectina na floculação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : (a) íons de cálcio permitem que as lectinas alcancem sua conformação ativa e (b) as lectinas ativam a floculação.....	18
Figura 4.1 - Fluxograma representativo das etapas realizadas no trabalho.....	23
Figura 4.2- Unidade de trabalho.....	24
Figura 4.3- Fermentador operando em batelada alimentada.....	25
Figura 4.4 - Câmara de Neubauer e posição dos quadrantes.....	28
Figura 5.1 - Formação de flocos em meio de crescimento.....	40
Figura 5.2 - Comportamento das cepas floculantes em meio de crescimento.....	40
Figura 5.3 - Perfis de sedimentação das quatro cepas de leveduras floculantes.....	42
Figura 5.4 - Regressão linear para determinação da velocidade específica de crescimento. ...	44
Figura 5.5 - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante fermentação não aerada.....	51
Figura 5.6 - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação aerada.....	53
Figura 5.7 - Comparativo entre fermentação aerada e não aerada.....	54
Figura 5.8 - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação preliminar.....	56
Figura 5.9 - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 1.....	58
Figura 5.10 - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 2.....	59
Figura 5.11 – Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 3.....	60
Figura 5.12 – Comparação entre fermentação preliminar e fermentação 2.....	61
Figura 5.13 – Concentrações de ART para fermentações 1 (preto), 2 (vermelho) e 3 (azul). .	62
Figura 5.14 – Concentrações de etanol para as fermentações 1 (preto), 2 (vermelho) e 3 (azul). .....	63

Figura 5.15 – Concentração celular para as fermentações 1 (preto), 2 (vermelho) e 3 (azul)..	64
Figura 5.16 - Perfis de concentração de ART e etanol em função do tempo para o P'máx. ....	67
Figura 5.17 – Comparação dos dados simulados e experimentais para concentrações de açúcares reductores, etanol e de células durante a fermentação 2. ....	70
Figura 5.18 - Comparação dos dados simulados e experimentais para concentrações de açúcares reductores, etanol e de células durante a fermentação 1. ....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Condições das fermentações em batelada alimentada.....	34
Tabela 5.1 - Parâmetros cinéticos obtidos para cada cepa. ....	41
Tabela 5.2 – Concentrações de minerais analisados nos melaços de cana-de-açúcar.....	45
Tabela 5.3 – Concentrações dos ácidos orgânicos na amostra de melaço.....	45
Tabela 5.4 – Eficiência média da fermentação alcoólica para cada condição testada.....	47
Tabela 5.5 – Variação de crescimento celular médio para cada condição testada. ....	48
Tabela 5.6 - Viabilidade celular no tempo 0 e 18 horas para cada condição experimental. ....	49
Tabela 5.7 - Contagem de células viáveis e não viáveis durante a fermentação sem aeração. ....	52
Tabela 5.8 - Contagem de células viáveis e não viáveis durante a fermentação aerada. ....	53
Tabela 5.9 - Contagem de células viáveis e não viáveis e viabilidade celular durante a fermentação. ....	57
Tabela 5.10 - Viabilidade celular durante as fermentações 1, 2 e 3.....	64
Tabela 5.11 - Parâmetros analisados nas fermentações 1, 2 e 3.....	66
Tabela 5.12 – Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo....	69

## LISTAS DE SÍMBOLOS

ART	Açúcares redutores totais	
NG	<i>Normal gravity</i> - concentração normal	
HG	<i>High gravity</i> - concentração alta	
VHG	<i>Very high gravity</i> - concentração muito alta	
ETOH	Massa de etanol	g
$\epsilon_{P/ART}$	Eficiência da fermentação alcoólica	%
F	Fluxo de alimentação	L/h
$K_{IS}$	Constante de inibição do crescimento celular pelo substrato	g/L
$K_s$	Constante de saturação para o crescimento celular	g/L
$\mu_{máx}$	Taxa específica máxima de crescimento celular	$h^{-1}$
$\mu$	Taxa específica de crescimento celular	$h^{-1}$
m	Potência do termo de inibição pelo substrato	
MX	Quantidade celular produzida	cél
MS	Massa de ART consumida	g
$MS_i$	Massa de ART inicial	g
$MS_f$	Massa de ART final	g
$m_s$	Constante de manutenção celular	g/(cél.h)
$m_p$	Constante de produção de etanol não associado ao crescimento	g/(cél.h)
NCO	Nível de conversão de substrato	%
n	Potência do termo de inibição pelo produto	
$\emptyset$	Produtividade	g/(L.h)
P	Concentração de etanol	g/L
$P_0$	Concentração de etanol inicial	g/L
$P_f$	Concentração de etanol final	g/L
$P_{máx}$	Concentração máxima de etanol em que cessa o crescimento microbiano	g/L
$P'_{máx}$	Concentração máxima de etanol	g/L
Rend	Rendimento em etanol em relação ao açúcar adicionado	%
$S_{máx}$	Concentração máxima de substrato	g/L
S	Concentração de açúcares redutores totais	g/L
$S_a$	Concentração de açúcares redutores totais na alimentação	g/L

$S_0$	Concentração de açúcares redutores totais inicial	g/L
$t_f$	Tempo de fermentação	h
$t_g$	Tempo de geração	h
$V_m$	Volume de meio	L
$V_0$	Volume inicial	L
$V_f$	Volume final	L
VCS	Velocidade de Consumo de Substrato	g/(L.h)
V	Volume do reator	L
$Y_{x/s}$	Coeficiente de rendimento celular	cél/g <sub>s</sub>
$Y_{p/s}$	Coeficiente de rendimento em etanol	g <sub>e</sub> /g <sub>s</sub>
X	Concentração celular	cél/L
$X_0$	Concentração celular inicial	cél/L
$X_f$	Concentração celular final	cél/L

## RESUMO

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, apresentando uma posição favorável por apresentar vantagens na tecnologia de produção, como grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis. Além disso, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, a qual é matéria-prima mais eficiente conhecida para a produção de etanol, sendo sua produção a partir do caldo de cana um processo bem estabelecido no país. Estes fatores, juntamente com a crescente demanda mundial por etanol, tornam o Brasil altamente competitivo na sua comercialização. O melaço, principal subproduto da indústria açucareira, apresenta elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, sendo por isso uma potencial matéria-prima para fins de produção de bioetanol. Com a finalidade de reduzir os custos de produção, estudos são impulsionados na direção de encontrar leveduras e processos alternativos que alcancem altos rendimentos e produtividades para a fermentação alcoólica. A utilização de leveduras flocculantes na produção do bioetanol permite a eliminação da etapa de centrifugação, uma vez que estas leveduras são facilmente decantáveis na ausência de açúcares fermentescíveis. Adicionalmente, a tecnologia de fermentação sob alta concentração de açúcar, conduzida em batelada alimentada minimiza o efeito da inibição pelo substrato. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições da fermentação em batelada alimentada, utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de características flocculantes em altas concentrações de melaço de cana-de-açúcar. Foi realizado um estudo da capacidade fermentativa e de flocculação de quatro cepas flocculantes, que resultou na escolha da cepa *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, doada pelo Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Após a escolha da cepa foi determinado seu tempo de geração utilizando meio sintético, obtendo um valor igual a 1,071 h. Avaliou-se a influência da suplementação com os nutrientes ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura) na fermentação em batelada de meio à base de melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações, obtendo a maior eficiência (85,4%) utilizando solução de melaço 30,0% v/v sem adição de nutrientes. Verificou-se também que a adição de nutrientes no meio fermentativo à base de melaço não melhora a eficiência do processo para concentrações de melaço acima de 20,5% v/v. A aeração na fermentação NG em batelada alimentada foi estudada como forma de melhorar o processo, entretanto a aeração favoreceu o crescimento celular em detrimento da produção de etanol. Posteriormente avaliou-se três fermentações, HG e VHG, com alimentação à base de melaço com concentrações diferentes de ART. O total de ART adicionado nas fermentações foi de 209, 222 e 250 g/L. A fermentação de 225 g/L de ART resultou em melhor eficiência (89,45%) com concentração final de etanol de 104,4 g/L enquanto a fermentação de 209 g/L de ART apresentou maior produtividade (2,98 g/(L.h)) dentre elas. A concentração máxima de etanol ( $P'_{\text{máx}}$ ) que a levedura C2/00 foi capaz de alcançar foi determinada, obtendo valor igual a 105,35 g/L. A partir dos dados experimentais da fermentação de 225 g/L foi proposto um modelo cinético, onde seus parâmetros foram determinados por meio do ajuste não linear dos dados. A velocidade específica máxima de crescimento foi de  $0,555 \text{ h}^{-1}$  com  $K_S$  e  $K_{IS}$  iguais a 2,63 e 12,437 g/L, respectivamente. Os resultados obtidos com os experimentos foram relevantes para a fermentação HG com melaço de cana-de-açúcar utilizando cepa flocculante. Para aumentar a concentração de etanol final no vinho outras estratégias devem ser adotadas para que a levedura consiga suportar maiores concentrações de etanol.

Palavras-chave: bioetanol, fermentação HG e VHG, batelada alimentada, suplementação.

## ABSTRACT

Currently Brazil is the second world's largest producer of ethanol, presenting a favorable position to present advantages in the technology of production, such as large cultivable areas and favorable climatic conditions. In addition, Brazil is the world's largest producer of sugarcane, which is the most efficient raw material known for the production of ethanol, being its production from sugarcane juice is a well-established process in the country. These factors together with the growing world demand for ethanol make Brazil highly competitive in its commercialization. Molasses, the main by-product of the sugar industry, has high concentrations of fermentable sugars, being therefore a potential raw material for the production of bioethanol. In order to reduce production costs, studies are promoted in the direction of finding yeasts and alternative processes that achieve high yields and productivities for alcoholic fermentation. The use of flocculent yeasts in the production of bioethanol allows the elimination of the centrifugation step, once these yeasts decant in the absence of fermentable sugars. Additionally, fermentation technology under high concentration of sugar, conducted in fed-batch, minimizes the effect of inhibition by substrate. The objective of this work was to study the conditions of fed-batch fermentation using a strain of *Saccharomyces cerevisiae* with flocculent characteristics in high concentrations of sugarcane molasses. A study of the fermentation and flocculation capacity of four flocculent strains was carried out, which resulted in the selection of the *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 strain donated by the Center of Chemical, Biological and Agricultural Research (CPQBA). After the choice of the strain was determined its generation time using synthetic medium, obtaining a value equal to 1,071 h. It was evaluated the influence of supplementation with nutrients ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  and yeast extract) in the batch fermentation of medium based on sugarcane molasses in different concentrations obtaining the highest efficiency (85.4%) using 30.0% v/v molasses solution without addition of nutrients. It has also been verified that the addition of nutrients in the molasses based fermentation medium does not improve the efficiency of the process for molasses concentrations above 20.5% v/v. Aeration in the NG fermentation in fed-batch was studied as a way to improve the process, however aeration favored cell growth in detriment of ethanol production. Subsequently, three fermentations, HG and VHG, with molasses based feed with different concentrations of ART were evaluated. The total amount of ART added in the fermentations was 209, 222 and 250 g/L. Fermentation of 225 g/L of ART resulted in better efficiency (89.45%) with final concentration of ethanol of 104.4 g/L while fermentation of 209 g/L of ART showed higher productivity (2.98 g/(Lh)) among them. The maximum concentration of ethanol ( $P'_{\text{max}}$ ) that the yeast C2/00 was able to reach was determined, obtaining a value equal to 105.35 g/L. From the experimental data of the fermentation of 225 g/L a kinetic model was proposed, where its parameters were determined by means of the nonlinear adjustment of the data. The maximum specific growth rate was  $0.555 \text{ h}^{-1}$  with  $K_S$  and  $K_{IS}$  equal to 2.63 and 12.437 g/L, respectively. The results obtained with the experiments were relevant for HG fermentation with sugarcane molasses using flocculent strain. To increase the final ethanol concentration in the wine, other strategies must be adopted so that the yeast can withstand higher concentrations of ethanol.

Keywords: bioethanol, HG and VHG fermentation, fed-batch, supplementation.

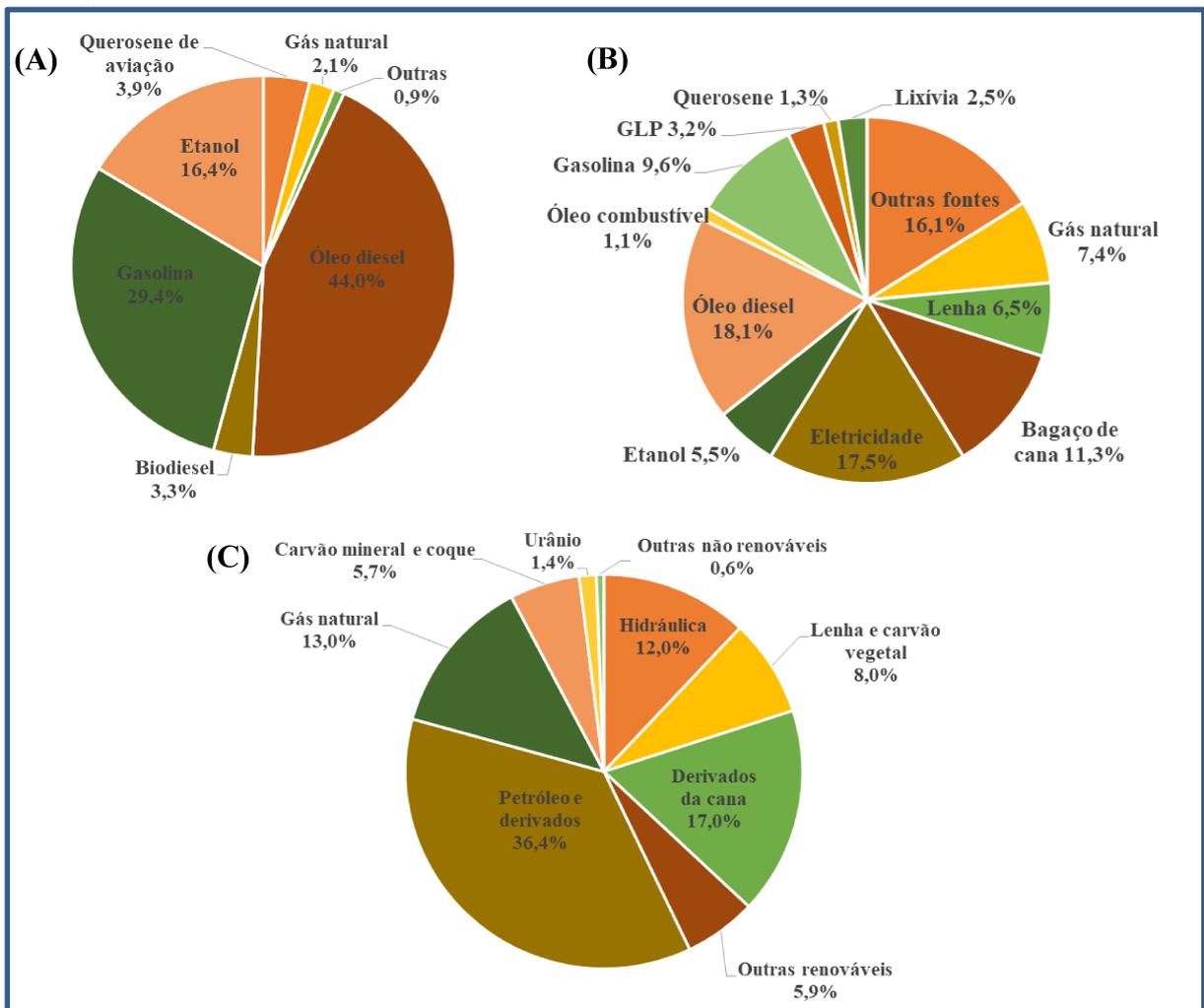
# 1 INTRODUÇÃO

A produção global de biocombustíveis vem crescendo de forma constante ao longo da última década, de 16 bilhões de litros em 2000 aumentou para cerca de 110 bilhões de litros em 2013. Em 2014 praticamente não houve crescimento. Em 2017 a produção cresceu um pouco mais de 3,2% em relação ao ano anterior. Dessa forma os combustíveis fósseis, que tem como base o petróleo, serão cada vez mais substituídos pelos biocombustíveis. Para 2050 está previsto que 25% do fornecimento de energia mundial dos transportes serão provenientes de fontes renováveis (ENMC, 2017; NOVACANA, 2018).

Até 2005, o Brasil foi o principal produtor mundial de bioetanol, tendo sido ultrapassado pelos EUA em 2006. Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de etanol (ANP, 2018). A produção de etanol na safra 2017/2018 foi de 27,8 milhões de m<sup>3</sup>, sendo 16,5 milhões de m<sup>3</sup> de etanol hidratado e 11,4 milhões de m<sup>3</sup> de etanol anidro (UNICA, 2019). A estimativa da produção da safra 2018/2019 foi de 33,14 milhões de m<sup>3</sup>, com um aumento de 21,7%. Este incremento na produção se deve à maior destinação de açúcar total recuperável para produção de etanol em detrimento da produção de açúcar (CONAB, 2019).

Quanto à produção de etanol, o Brasil apresenta uma posição favorável por apresentar vantagens na tecnologia de produção, no mercado de biocombustíveis sem necessidade de ampliar área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos, possibilidade de liderança na agricultura de energia e diversidade de matérias-primas em diferentes biomas. Além disso, a matriz energética brasileira é um exemplo de sustentabilidade: 42,9% de toda energia primária produzida no Brasil provem de fontes renováveis. A maior parte da energia renovável é proveniente da biomassa da cana-de-açúcar, correspondendo a 17%. Apenas 5,5% do consumo final de energia tem como fonte o etanol. Quando se trata do consumo de energia apenas nos transportes o uso de etanol representa 16,4% (Figura 1.1) (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2018). Em 2018 a participação do etanol (hidratado e anidro) na matriz de combustíveis utilizados pela frota de veículos de passeio e de carga leve atingiu 50,2%, a maior da história (UNICA, 2018a).

**Figura 1.1** - (A) Consumo de energia nos transportes; (B) Consumo final de energia por fonte; (C) Oferta interna de energia.



Fonte: Adaptado de Balanço Energético Nacional, 2018.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, apresentando por isso grande relevância no ramo de agronegócio. As grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis, juntamente com a demanda crescente mundial por etanol tornam o Brasil altamente competitivo na comercialização mundial do etanol (CONAB, 2019). Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento e aprimoramento de processos que gerem economia no setor.

As plantas brasileiras atuais de bioetanol apresentam um alto rendimento e preservam a viabilidade celular. As mesmas também utilizam uma baixa concentração de açúcares, garantindo a conclusão da fermentação em um curto período de tempo. Entretanto, o processo gera vinhas com uma baixa concentração de etanol (7 - 12% v/v), conseqüentemente um maior volume de vinhaça residual é produzido, aumentando também os gastos com energia durante a destilação. Assim, o uso da tecnologia de fermentação em alta concentração de açúcar (HG) e concentração muito alta de açúcar (VHG) surge como uma alternativa para redução de custos

de destilação. O processo em VHG permite a obtenção de vinhos com maiores teores alcoólicos, sendo possível obter mais etanol a partir de um mesmo volume de vinho gerando, portanto, menos gastos com tratamentos posteriores (BARBOSA et al., 2016; YAMAKAWA, 2016; ARSHAD et al., 2017; FERMENTEC, 2018). Por exemplo para um teor de 8% (v/v) no vinho final produz-se cerca de 10 litros de vinhaça por litro de etanol na destilação por aquecimento indireto e 12 litros de vinhaça por litro de etanol na destilação por aquecimento direto, entretanto se o teor alcoólico no vinho aumenta para 12% (v/v), é possível a obtenção de 7 a 8 litros de vinhaça por litro de etanol (LOPES, et al., 2016; AMORIM, et al., 2018).

Outra alternativa para redução de custos é a utilização de leveduras flocculantes na produção do bioetanol, a qual permite a eliminação da etapa de centrifugação, uma vez que estas leveduras decantam na ausência de açúcares fermentescíveis. Estas leveduras, após transformarem os açúcares presentes no meio em álcool, se agregam em forma de flocos e concentram-se no fundo do reator (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

A utilização de matérias-primas alternativas e baratas para produção de etanol também é muito estudada. O melaço de cana-de-açúcar é o principal subproduto obtido a partir da fabricação do açúcar cristalizado. Ele é rico em nutrientes e apresenta concentrações elevadas de açúcares redutores totais, sendo por isso uma das matérias-primas importantes para fins da produção de bioetanol (CHIEPPE JÚNIOR, 2011).

Diante do exposto acima, estudou-se o processo de fermentação em alta concentração de açúcares redutores totais provenientes do melaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada utilizando uma levedura de características flocculantes com o intuito de otimizar a produção de etanol.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O trabalho teve como objetivo principal estudar as condições da fermentação em batelada alimentada, utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes em altas concentrações de melaço de cana-de-açúcar.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a capacidade fermentativa e a capacidade de floculação de quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes no processo de fermentação alcoólica;
- Estudar o tempo de geração da levedura de característica floculante selecionada para continuação do trabalho;
- Caracterizar a composição do melaço de cana-de-açúcar;
- Estudar a influência da suplementação do meio de fermentação com nutrientes no processo de fermentação utilizando altas concentrações de melaço de cana-de açúcar;
- Estudar o comportamento da cepa floculante no processo fermentativo em batelada alimentada utilizando meio à base de melaço de cana-de-açúcar;
- Estudar o efeito da microaeração na fermentação do melaço de cana-de açúcar;
- Determinar a concentração máxima de etanol suportada pela levedura;
- Estudar a cinética fermentativa simulando condições reais do processo.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são derivados da conversão da biomassa e podem ser definidos como o combustível no qual a energia é proveniente da fixação biológica de carbono. Devido a fatores como a necessidade de aumentar a segurança energética, subsídios governamentais, aumento do preço do petróleo e a preocupação com a emissão de gases provenientes de combustíveis fósseis, os biocombustíveis estão despertando a atenção pública e científica (SHALABY, 2013; PULIGUNDLA et al., 2019).

Os biocombustíveis ajudam a reduzir a emissão de CO<sub>2</sub> de duas formas: ao evitar o uso de combustíveis fósseis e ao reciclar o CO<sub>2</sub> que é liberado durante a sua queima. Na produção do bioetanol são utilizadas matérias-primas que absorvem CO<sub>2</sub> durante seu crescimento, retirando-o da atmosfera. Assim, todo ou grande parte do CO<sub>2</sub> liberado durante a queima do bioetanol é novamente absorvido pela nova biomassa cultivada para produção de bioetanol (STHEL et al., 2013).

Há basicamente quatro fontes de biocombustíveis:

- 1) Carboidratos - milho, cana-de-açúcar, beterraba, trigo, mandioca, materiais lignocelulósicos, entre outros. São muito utilizados na produção de bioetanol;
- 2) Óleos – óleo vegetal refinado ou residual proveniente de soja, canola, girassol, milho, entre outros, sendo utilizado na produção de biodiesel;
- 3) Algas – são organismos unicelulares que realizam fotossíntese, convertendo o dióxido de carbono em oxigênio e hidrogênio. As microalgas são capazes de armazenar lipídeos, os quais são utilizados na produção de biodiesel, e o hidrogênio liberado na fotossíntese pode ser utilizado como combustível;
- 4) Resíduos agrícolas – são de origem orgânica e são utilizados na produção de biogás (SHALABY, 2013; GONÇALVES et al., 2015).

De acordo com a matéria-prima utilizada, origem e processo de fabricação, o bioetanol é classificado em: 1ª geração, derivados de sementes, grãos ou açúcares (amido e sacarose); 2ª geração, derivados de materiais lignocelulósicos; 3ª geração, derivados de algas marinhas, baseiam-se na intervenção direta para produção de biomassa utilizando o melhoramento genético (PICAZO-ESPINOSA; GONZALEZ-LOPEZ; MANZANERA, 2011).

Da mesma forma o bioetanol pode ser obtido de diversas matérias-primas, sendo que estas matérias-primas, de acordo com seu insumo, podem ser de três tipos:

- Açúcares (sacacrose, glicose e frutose): cana-de-açúcar, sorgo sacarino, melado, beterraba. Via fermentação os açúcares são convertidos diretamente em etanol;
- Amidos: grãos (trigo, milho, cevada, etc.) e tubérculos (batata, mandioca, etc.). Os amidos são convertidos em açúcares por um processo denominado sacarificação e posteriormente são fermentados;
- Lignocelulósicos: lixo negro, resíduos agroflorestais, gramíneas, entre outras. Por hidrólise a celulose e hemicelulose são convertidas em açúcares, posteriormente o caldo hidrolítico é destoxificado e fermentado (LEAL et al., 2008).

No Brasil para o estabelecimento efetivo da produção de etanol lignocelulósico é necessário ainda uma redução de custos de processo. Por outro lado, o etanol produzido a partir do caldo de cana-de-açúcar é um processo bem estabelecido, lucrativo e extremamente vantajoso, havendo uma imensa área para o cultivo da matéria-prima sem comprometer a produção alimentar. Assim, o país obteria maiores benefícios, a curto prazo, por meio do investimento no melhoramento do processo de obtenção do etanol de primeira geração (BRASSOLATI et al., 2016).

### **3.2 Etanol de primeira geração**

O bioetanol, além de ser uma fonte renovável de energia, contribui para a redução das emissões de dióxido de carbono. Entre janeiro e junho de 2018, o consumo médio mensal de 2,2 bilhões de litros de etanol (anidro e hidratado) pela frota flex evitou a emissão de 32 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> na atmosfera, o que é um recorde em uma série histórica de 15 anos (UNICA, 2018b).

O bioetanol pode ser misturado à gasolina em proporções de 10-85% para motores de combustão interna ou substituir a gasolina em qualquer proporção em motores *flexfuel* e ainda pode ser adicionado em proporções de 5-10% ao óleo diesel para utilização em motores a diesel. A mistura de bioetanol com gasolina aumenta a octanagem do combustível, o que consequentemente reduz a emissões de compostos aromáticos e cancerígenos, como monóxidos e compostos orgânicos voláteis (NICOLA et al., 2011). A mistura de álcool anidro na gasolina sofreu aumento de 25% para 27% em todo país no ano de 2015, o que favoreceu o setor sucroalcooleiro, sendo o teor vigente (ANP, 2018).

No Brasil o etanol é produzido essencialmente a partir da cana-de-açúcar, que é a matéria-prima mais eficiente conhecida para a sua produção comercial. A energia total proveniente do etanol de cana é aproximadamente sete vezes superior à obtida pelo etanol de milho, produzido nos EUA, e quatro vezes superior à obtida pelo etanol de beterraba e de trigo na Europa. A redução de gases de efeito estufa do etanol de cana-de-açúcar também é três vezes maior que a do etanol de milho (BRASSOLATTI et al., 2016). Além disso, a utilização da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de álcool garante maior produtividade com custo de produção consideravelmente inferior ao etanol produzido a partir de outras biomassas (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). Todas estas questões colocam o Brasil em posição de destaque no cenário mundial, portanto, o bioetanol desempenha um papel imprescindível na economia brasileira.

No Brasil, são produzidos dois tipos de etanol: o etanol anidro, o qual contém no máximo 0,7% de água em relação ao peso e o hidratado, constituído de 7,4% de água em relação ao peso medido a 20°C (ABNT, 1978). O etanol hidratado é obtido por destilação convencional, já o etanol anidro é obtido por processos de desidratação do etanol hidratado por: destilação azeotrópica ou destilação extrativa ou utilizando a peneira molecular (FINGUERUT et al., 2008).

A produção brasileira de etanol de primeira geração é um processo bem consolidado atualmente, com a maior produtividade e os menores custos do mundo. Contudo, ainda há diversas possibilidades em pesquisa, desenvolvimento e inovação com o intuito de reduzir ainda mais os custos do processo (PACHECO, 2011). Dentre estas alternativas estão a utilização de leveduras floculantes, a utilização de altas densidades celulares no processo fermentativo, redução do estresse celular e o consequente aumento do rendimento e produtividade.

### **3.3 Fermentação alcóolica**

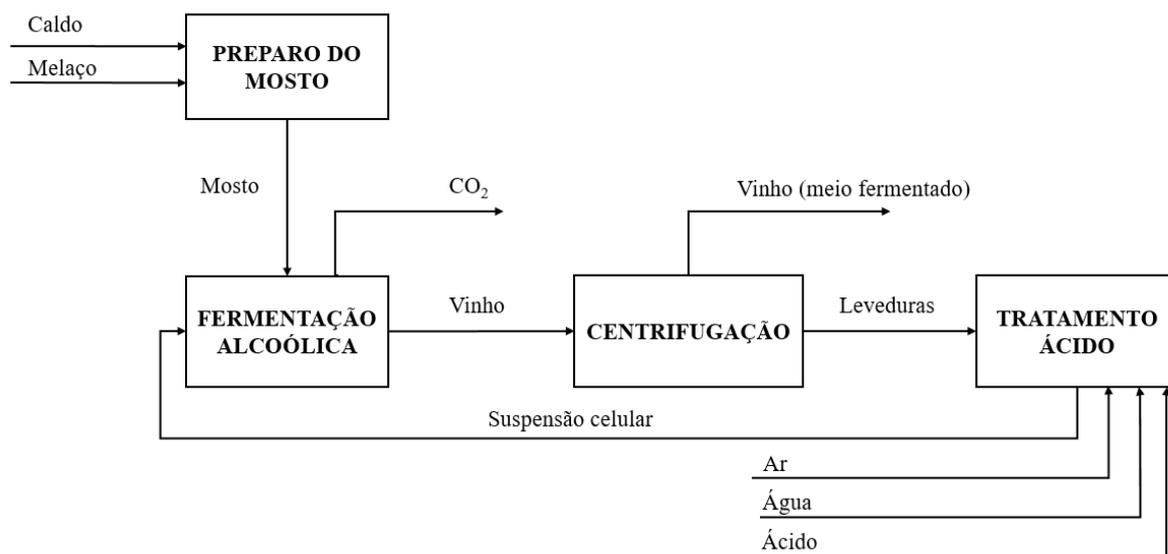
A produção de etanol brasileiro é feita a partir da fermentação do caldo e melaço de cana-de-açúcar, tipicamente conduzida por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. O caldo e o melaço de cana-de-açúcar são misturados em diferentes proporções, dependendo da disponibilidade do tipo de matéria-prima e as condições microbiológicas da levedura. Algumas destilarias utilizam apenas o caldo e outras apenas o melaço. Entretanto o melhor substrato consiste na mistura, uma vez que o caldo apresenta algumas deficiências nutricionais, que podem ser supridas pelo melaço, e o melaço, devido ao alto teor de sais minerais e alguns

compostos inibidores para a fermentação influencia diretamente na pressão osmótica levando à inibição das leveduras (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; ROSSEL; NOLASCO JUNIOR; YAMAKAWA, 2014).

A fermentação alcóolica no Brasil é caracterizada por alta densidade celular (10-14% g/v), com reciclo de células, temperatura entre 30 e 34°C, ciclos de fermentação entre 8 e 12 horas com vinhos fermentados finais contendo entre 7 e 12% v/v de etanol, operando em modo batelada, batelada alimentada ou contínua. Independente da configuração, a fermentação alcóolica é conduzida na presença de contaminantes. Ao final da fermentação dos açúcares, o mosto fermentado é enviado para centrifugação e recuperação das leveduras do processo para, então, fazer o reuso nas fermentações subsequentes (ROSSEL; NOLASCO JUNIOR; YAMAKAWA, 2014; YAMAKAWA, 2016; LOPES, et al., 2016; FERMENTEC, 2018).

O creme de leveduras é enviado às cubas de tratamento com agitadores e aeração, onde é adicionado então água na proporção volumétrica de 1:1, ácido sulfúrico concentrado até atingir pH entre 2 e 2,5. O tempo de tratamento varia de 1 a 2 horas dependendo das condições da levedura. Nesta etapa também se aplica antibiótico ou algum outro produto para o controle da contaminação bacteriana (YAMAKAWA, 2016). O tratamento com ácido permite a eliminação de contaminantes e células que já se apresentam em fase de degeneração, restando apenas as células jovens, as quais resistem ao baixo pH de 2,5 (CARVALHO; SATO, 2001; FINGUERUT et al., 2008; GUIDINI, 2013). Após o tratamento, as leveduras são enviadas a um novo ciclo de fermentação. O vinho centrifugado praticamente isento de leveduras é enviado à etapa de destilação para recuperação, concentração e desidratação do etanol produzido (Figura 3.1) (ROSSEL; NOLASCO JUNIOR; YAMAKAWA, 2014).

**Figura 3.1** - Diagrama do processo de fermentação alcoólica com reciclo de células.



Fonte: Adaptado de Yamakawa (2016).

### 3.3.1 Processo em batelada

No processo em batelada o sistema recebe o inóculo de células ativas e a solução nutriente. Ao longo do processo fermentativo somente são adicionados oxigênio, quando conveniente (na forma de ar), antiespumante e ácidos ou bases para controle do pH. Terminada a fermentação, o fermentador é descarregado, e o meio fermentado segue para os tratamentos posteriores. Para iniciar um novo processo as dornas são higienizadas e carregadas novamente com mosto e inóculo. O volume no decorrer da fermentação permanece constante (CARVALHO E SATO, 2001; MEIRELES; PEREIRA, 2013).

A produtividade deste processo é comprometida devido à presença de tempos mortos durante o processo, devido a operações, como: carga de inóculo, centrifugação do meio fermentado e limpeza dos fermentadores (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

Li, Wang e Shi (2017) avaliaram a utilização de diferentes fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, ureia e sulfato de amônio) na fermentação em alta concentração de açúcar (VHG) de amido de milho 340 g/L utilizando o processo em batelada. Dentre as fontes de nitrogênio, o extrato de levedura 2% conduziu a um maior rendimento (84,5%) e concentração de etanol (20,3% v/v) após 72 horas de fermentação. Uma substituição parcial do extrato de levedura, com o intuito de reduzir custos, também foi estudada e a utilização de 0,6% de extrato de levedura, ureia 69 mM e sulfato de amônio 26 mM proporcionou resultados similares.

Ainda utilizando o processo em batelada, Kawa-Rygielska e Pietrzak (2014) também estudaram a suplementação com biomassa de levedura seca, fermento seco e extrato de levedura na fermentação VHG de purê de milho (360 g de milho por kg de purê). Em relação ao controle todas as fermentações suplementadas resultaram em maior produtividade, entretanto a utilização de biomassa de levedura seca conduziu a maior concentração final de etanol (142,3 g/L).

### **3.3.2 Processo em batelada alimentada**

O processo em batelada alimentada, também conhecido por Melle-Boinot na fermentação alcoólica, começou a ser utilizado nos anos 60, como uma alternativa aos problemas recorrentes no processo em batelada, como a formação de espuma e inibição pelo substrato (FERREIRA, 2005). Para a fermentação alcoólica é a configuração de processo predominante no Brasil (YAMAKAWA, 2016). Neste processo o meio contendo os nutrientes é adicionado, de forma contínua ou intermitente ao fermentador até alcançar o volume final e os produtos permanecem até o final do processo (CARVALHO; SATO, 2001).

No processo de batelada alimentada o inóculo inicial, previamente tratado, é transferido para os fermentadores por bombeamento. A suspensão de células representa 25 a 30% do volume do fermentador. Posteriormente inicia-se a alimentação com uma solução concentrada de substrato por 4 a 6 horas até alcançar o volume final do fermentador, representando aproximadamente 75% do tempo total de fermentação, permitindo uma melhor distribuição do calor produzido durante a fermentação. A vazão de alimentação normalmente é linear para que o calor de reação não ultrapasse a capacidade dos trocadores de calor. Quando sobra área de troca térmica e a velocidade de conversão dos açúcares em etanol é eficiente a vazão de alimentação pode ser aumentada, mas de forma que a concentração de açúcares fique em torno de 4°Brix. Ao término da alimentação ocorre a etapa de esgotamento dos açúcares. Após todo o açúcar ser convertido em etanol e outros produtos, o meio fermentado é centrifugado, ocorrendo a separação das células do vinho. As células são enviadas para os tanques de tratamento, para então iniciar um novo ciclo (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; YAMAKAWA, 2016).

Uma grande vantagem do processo em batelada alimentada consiste na redução da inibição pelo substrato, uma vez que o substrato é adicionado ao fermentador de modo controlado. Este tipo de inibição ocorre em concentrações de 65 g/L de glicose e 70 g/L de

frutose, as quais são dificilmente alcançadas em operações normais de fermentação (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

Outras vantagens deste processo podem ser citadas como: maior rendimento em etanol; altas produtividades; maior eficiência de limpeza dos equipamentos em relação ao processo contínuo, uma vez que o fermentador é esvaziado completamente no final do ciclo. Além disso, toda massa celular é enviada para o tratamento com ácido, tornando o processo com menor risco de contaminação em relação ao processo contínuo, onde apenas 15% das células são tratadas, e, conseqüentemente, tem-se uma fermentação mais pura (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; GUIDINI, 2013; MEIRELES; PEREIRA, 2013).

O rendimento fermentativo usualmente alcançado é de 88 a 91% e a produtividade é de 2 a 3,5 kg etanol/(m<sup>3</sup>.h). A concentração de etanol final típica no vinho é de 6 a 8% (v/v) para mosto à base de melão e de 8 a 12% (v/v) para mosto de caldo de cana-de-açúcar (YAMAKAWA, 2016).

Joannis-Cassan et al. (2014) testaram a fermentação de xarope de beterraba por *Saccharomyces cerevisiae* em VHG utilizando dois processos: batelada em vários estágios e batela alimentada, alcançando maior concentração de etanol (15,2%) em menor tempo (53 horas), sem sacarose residual, por meio do processo em batelada alimentada. Os autores também verificaram que uma alimentação por um curto período (16,6 horas) reduziu a inibição, tanto pela alta concentração de açúcar quanto pelo etanol.

GUIDINI et al. (2014) também estudaram a fermentação da *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes em batelada alimentada para a otimização das condições do processo (concentração de sacarose, concentração celular e tempo de enchimento) utilizando um planejamento composto central. As condições otimizadas, foram: concentração de sacarose 170 g/L, concentração celular de 40% v/v e tempo de enchimento de 6 horas, nessas condições obtiveram um rendimento em etanol de 92,20% e uma produtividade de 6,01 g/(L.h). A recirculação do meio de fermentação também foi avaliada pelos pesquisadores, sendo possível reduzir o tempo de fermentação de 10,5 para 9 horas, reduzir a concentração de açúcar residual e aumentar a produtividade e o rendimento para 9,26 g/(L.h) e 92,75%, respectivamente.

### **3.3.3 Processo contínuo**

No processo de fermentação contínuo o volume total de meio é mantido constante, havendo uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante e a

retirada contínua de meio cultivado à mesma vazão. Este processo pode operar por longos períodos de tempo em regime estacionário, o qual é alcançado devido à manutenção do volume constante no fermentador (MEIRELES; PEREIRA, 2013).

Tradicionalmente no processo contínuo de produção de etanol é utilizado quatro ou cinco fermentadores conectados em série e uma unidade de tratamento do fermento. Neste sistema o meio de cultivo e as células de leveduras são adicionados simultaneamente de forma contínua no primeiro fermentador, sendo que o açúcar adicionado deve ser proporcional à quantidade de células (taxa média de 3,5 g de ART por g de massa celular). O meio de fermentação então flui, até chegar ao último, de um fermentador para o outro, de onde é conduzido às centrífugas para separação do fermento do vinho. A unidade de tratamento do fermento é composta por três tanques em série. O creme de fermento, o ácido sulfúrico e a água são misturados em um tanque pequeno, a partir deste tanque o fermento acidificado segue para o tanque de tratamento. Este material, então, flui de um tanque para o outro até chegar ao terceiro tanque, de onde é levado para o primeiro fermentador do sistema (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; YAMAKAWA, 2016).

Algumas vantagens do processo contínuo podem ser citadas: obtenção do caldo fermentado uniforme, facilitando os processos de extração e recuperação de produtos; manutenção das células em um mesmo estado fisiológico; maior facilidade e economia de controle e automação; menor necessidade de mão-de-obra; o aumento da produtividade do processo, devido a redução dos tempos mortos ou não-produtivos. Entretanto há também algumas desvantagens: maior investimento inicial na planta; possibilidade de ocorrência de mutações genéticas; maior possibilidade de ocorrência de contaminações, uma vez que apenas 15% das células do fermento em processo são tratadas e o fermentador nunca é esvaziado; dificuldade de manutenção da homogeneidade no reator quando se trabalha com baixas vazões; dificuldades de operação em estado estacionário devido à formação de espuma e crescimento de microrganismos nas paredes do reator, nos sistemas de entrada ou saída de líquidos (FACCIOTTI, 2001; ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; MEIRELES; PEREIRA, 2013).

Santos et al. (2015) utilizaram um sistema de dois fermentadores, tipo torre, com intuito de analisar a influência simultânea dos fatores: concentração de sacarose na alimentação ( $S_0$ ), vazão de reciclo para o primeiro reator ( $V$ ) e tempo de residência total ( $TR$ ), por meio de um planejamento composto central. Os resultados otimizados previsto pelo modelo para a condição  $S_0 = 225 \text{ g / L}$ ,  $V = 5 \text{ mL/s}$  e  $TR = 8 \text{ h}$ , foram um rendimento total de 92,82% com base em

consumo de açúcares redutores totais, produtividade total de 13,33 g/(L.h) e açúcar residual de 18,46 g/L. A validação do ponto ótimo resultou em valores próximos aos obtidos pelo modelo, indicando sua reprodutibilidade. Além disso, o sistema de dois reatores torre com reciclagem de células floculantes funcionou eficientemente por 20 dias, utilizando misturas de suco de cana-de-açúcar e melão, com concentração de açúcares redutores totais igual a 175-216 g/L e produziu um rendimento de 90%.

### **3.4 Fermentação sob altas concentrações de açúcares**

As fermentações para a produção de etanol, dependendo da concentração de açúcar, são divididas em: concentração normal de açúcares (*Normal gravity* – NG, até 180 g/L de açúcares), alta concentração de açúcares (*High gravity* – HG, 180-240 g/L de açúcares) e concentração muito alta de açúcares (*Very high gravity* – VHG, maior que 250 g/L de açúcares) (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Nas últimas três décadas a tecnologia de fermentação de etanol sob condições HG e VHG registraram progressos significativos, devido aos benefícios ambientais e econômicos (PULIGUNDLA et al., 2019). A tecnologia de fermentação HG e VHG oferece algumas vantagens como a economia de água, redução dos custos da destilação, de capital e de energia por litro de álcool, redução do risco de contaminação bacteriana e, além disso, permite o aumento da produção de álcool sem alterar a capacidade da planta e o número de funcionários. Também espera-se com a fermentação VHG obtenção de ganhos de rendimentos, devido à redução da quantidade de etanol residual arrastado na vinhaça e da quantidade de ART residual arrastada com o vinho (THOMAS et al., 1995; ROSSEL; NOLASCO JUNIOR; YAMAKAWA, 2014).

As plantas atuais brasileiras de bioetanol apresentam um alto rendimento e preservam a viabilidade celular. Além disso, elas utilizam uma baixa concentração de açúcares, garantindo a conclusão da fermentação em um curto período de tempo. Entretanto o processo gera vinhos com uma baixa concentração de etanol (7 - 12% v/v), conseqüentemente um maior volume de vinhaça residual é produzido, aumentando também os gastos com energia durante a destilação (BARBOSA et al., 2016; ARSHAD et al., 2017; FERMENTEC, 2018).

Vários estudos foram realizados, utilizando a tecnologia HG e VHG, com o intuito de aperfeiçoar o processo de obtenção do etanol. Deesuth et al. (2015) obtiveram maiores

concentrações de etanol utilizando o processo VHG (126,3 g/L de etanol) em comparação ao processo HG (95,3 g/L de etanol).

Pereira et al. (2010) otimizaram a fermentação alcoólica a partir de 308 g/L de glicose quanto à composição do meio, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo fermentador, obtendo maior produção de etanol (139 g/L) utilizando um meio composto por 44,3 g/L de licor íngreme de milho, 2,3 g/L de uréia, 3,8 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,03 g/L de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . Quando estas condições foram testadas em uma estirpe industrial foi obtida uma concentração de etanol de 147 g/L, sendo que a estirpe industrial foi capaz de fermentar até 330 g/L de glicose com um rendimento de 93%.

Uma desvantagem dos processos HG e VHG é a ocorrência de efeitos adversos no metabolismo das leveduras devido às altas pressões osmóticas, resultando em perda de viabilidade celular e redução da taxa de produção de etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008), além da utilização incompleta de substrato no final da fermentação (LIU et al., 2016). A alta concentração de etanol alcançada pelo processo também provoca a perda da integridade da membrana celular (COT et al., 2007). Na presença de etanol a permeabilidade da membrana lipídica a alguns íons é alterada, principalmente aos íons  $H^+$ . À medida que os íons entram na célula ocorre um desequilíbrio do gradiente eletroquímico afetando a força motriz do próton culminando com a redução do pH intracelular. Adicionalmente há outros efeitos sobre a fisiologia da levedura como inibição do crescimento e inativação enzimática (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Um dos grandes impasses da tecnologia VHG aplicado à fermentação alcoólica é a manutenção da atividade e viabilidade das leveduras ao longo de uma safra inteira (ROSSEL; NOLASCO JUNIOR; YAMAKAWA, 2014).

Phukoetphim et al. (2017a) estudaram a tolerância ao etanol das cepas de *S. cerevisiae* NP01 e ATCC 4132. Para tal, inoculou as células em meio de suco de sorgo doce 100g/L, juntamente com diferentes concentrações de etanol (0, 6, 9, 12, 15 e 18% (v/v)). A concentração de apenas 6% em etanol foi suficiente para afetar a velocidade de crescimento específica ( $\mu$ ), à medida que as concentrações de etanol aumentaram o  $\mu$  diminuiu acentuadamente. A inibição estava completa em 9-12% de etanol após 24 horas.

A tolerância ao etanol depende de dois fatores: da resistência da cepa de levedura utilizada e da composição do meio de crescimento (PHUKOETPHIM et al., 2017b). Dessa forma, o estresse osmótico ocasionado pela tecnologia de fermentação sob altas concentrações de açúcares pode ser contornado pela adição de nutrientes no meio de fermentação. Assim, para obter altas concentrações de etanol utilizando a tecnologia HG e VHG são estudados vários

fatores, como: nitrogênio, oligoelementos, vitaminas e/ou aeração. O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais na fermentação para a produção de etanol, pois promove o crescimento da levedura e a utilização do açúcar, melhora a produtividade do processo, assim como a concentração final de etanol alcançada pelo processo e a tolerância ao álcool pela levedura (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

A aeração ajuda a levedura a tolerar o estresse ocasionado pelo etanol por meio da síntese de esteróis e ácidos graxos insaturados, envolvidos na manutenção da saúde da membrana celular (FORNAIRON-BONNEFOND et al., 2002). O oxigênio também promove a regeneração celular por meio do ciclo do ácido cítrico e da via respiratória, redirecionando a síntese bioenergética e a utilização de carbono (LIU et al., 2016).

A resistência ao etanol pela levedura também é influenciada pela temperatura do processo. De acordo com o estudo de Rivera e colaboradores (2017) a variação de temperatura influenciou os parâmetros cinéticos do processo e, conseqüentemente, a resistência de *Saccharomyces cerevisiae* ao etanol aumentou com a redução de temperatura do processo fermentativo, sendo possível alcançar maiores concentrações finais de etanol.

O efeito da taxa de aeração (0,05; 0,20 e 0,35 vvm) e da adição de dois nutrientes: extrato de levedura (3 e 6 g/L) e levedura seca (subproduto da indústria cervejeira) (4,5 e 9,0 g/L) foram avaliados por Deesuth et al. (2015) na fermentação de suco de sorgo doce por *Saccharomyces cerevisiae* NP 01. As fermentações foram realizadas em batelada, à temperatura de 30°C e 200 rpm de agitação, utilizando duas concentrações de suco de sorgo: 200 g/L (HG) e 280 g/L (VHG). Sob condições HG a utilização de ambos os suplementos de nitrogênio não apresentou efeito positivo sobre o crescimento celular, entretanto a produtividade de etanol aumentou. Da mesma forma, no processo VHG a suplementação com nitrogênio e oligoelementos ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ ), juntamente com uma pequena aeração, promoveram a eficiência da produção de etanol. Além disso, a aeração reduziu a produção de glicerol, indicando menor estresse celular devido à alta concentração de açúcares. Adicionalmente, os autores do estudo concluíram que a levedura seca pode ser utilizada como suplemento de baixo custo em substituição ao extrato de levedura. Ainda utilizando as mesmas condições e levedura deste processo VHG, Deesuth, Laopaiboon e Laopaiboon (2016), otimizaram a taxa de aeração (0,05-0,50 vvm) e o tempo de aeração (12-24 h), encontrando uma produção máxima de etanol (127,8 g/L) após 12,01 h de aeração a uma taxa de 0,31 vvm. No entanto a fonte de nitrogênio foi substituída por 3,45 g/L de ureia, evidenciando novamente a importância da suplementação e aeração no processo.

### 3.5 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço é o líquido que se obtém como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado resultante da etapa de centrifugação. Sendo considerado o principal subproduto da indústria do açúcar, é o licor-mãe da cristalização final do açúcar, e a cada tonelada de cana moída, em média, 40 a 60 kg de melaço são produzidos (CHIEPPE JÚNIOR, 2011). A composição típica do melaço de cana-de-açúcar é de 25 a 35% de sacarose, 20 a 35% de açúcares redutores (glicose e frutose), 10 a 16% de cinzas e 0,5% de polissacarídeos (YAMAKAWA, 2016).

Comparando o melaço com o caldo de cana-de-açúcar, o melaço apresenta maior conteúdo de nutrientes. Entretanto, como é resultante da fabricação do açúcar, onde é exposto a altas temperaturas, o melaço apresenta componentes que podem interferir no processo fermentativo. Estes componentes são representados por ácidos orgânicos de baixo peso molecular (lático, acético, fórmico), hidroximetilfurfural, melanoidinas, entre outros. Geralmente as fermentações que utilizam apenas o melaço como substrato apresentam maiores problemas do que as que utilizam suco de cana-de-açúcar devido à presença de compostos inibidores e à alta pressão osmótica (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

Pradeep e Reddy (2010) avaliaram a utilização de diferentes níveis de concentração de sólidos dissolvidos (30 a 40° Brix) e suplementação com ureia, peptona, extrato de levedura, leite desnatado, farelo de trigo e farinha de soja na fermentação de alta concentração de melaço de cana-de-açúcar. A fermentação foi realizada em batelada por 72 horas utilizando a levedura *Sacchromyces bayanus*. Considerando o teor de sólidos dissolvidos, maiores eficiências de produção de etanol foram obtidas até 34° Brix. Dentre as fontes de nitrogênio a uréia foi considerada a mais adequada para a fermentação do melaço. Além disso, a suplementação possibilitou a redução do tempo de fermentação para 48 horas, concentrações finais de etanol de 13,6% (v/v) e aumento do rendimento de 76,5 para 87,5%.

Barbosa et al. (2016) também analisaram a suplementação com nitrogênio em fermentações sucessivas VHG. Os resultados indicaram que a fermentação foi eficiente apenas com a suplementação com peptona, na sua ausência houve perda de viabilidade entre ciclos. Os autores ainda obtiveram altos níveis de etanol (16% v/v) na fermentação do meio, contendo elevada concentração de sacarose (30%), proveniente do melaço e suco de cana-de-açúcar, após 10 horas de fermentação em *shaker*.

Arshad et al. (2017) estudaram os efeitos da taxa de aeração e concentração de melaço na produção de etanol. A fermentação foi realizada em escala industrial utilizando

fermentadores de 300 m<sup>3</sup>, em batelada alimentada com alimentação de 15 m<sup>3</sup>/h ao longo de 16 h, por um tempo total de 60 h. As taxas de aeração avaliadas foram 0; 0,2; 0,4 e 0,6 vvm (volume de ar por volume de meio fermentado por minuto) e o melaço nas concentrações de 32, 36 e 40° Brix. Com o estudo foi possível perceber que a taxa de aeração afetou positivamente mais o processo com maior concentração de açúcares, além disso, 0,2 vvm e 40 °Brix conduziram a uma maior produção de etanol (12,2% v/v) e menor formação de subprodutos. A baixa aeração (0,2 vvm) auxiliou as leveduras a superarem o estresse osmótico no início da fermentação e o estresse oxidativo ocasionado pelo etanol no final do processo, aumentando, assim, a viabilidade celular em todos os níveis de melaço.

Rivera et al. (2017) obtiveram um rendimento de 90%, produtividade de 10,2 g/(L.h) e concentração final de etanol de 120 g/L após 11,5 h de fermentação em batelada alimentada com reciclo de células, utilizando uma concentração de células de 80 g/L (base seca) e um total de 400 g/L de açúcares redutores proveniente do melaço e caldo de cana-de-açúcar. Os autores atribuíram a concentração final de etanol alcançada à suplementação do meio, à taxa de aeração de 0,2 vvm juntamente com a redução de temperatura ao final do processo.

### **3.6 Leveduras floculantes**

A floculação foi um mecanismo bastante estudado na fabricação de cerveja para facilitar a recuperação da biomassa, entretanto a aplicação de leveduras floculantes na produção de etanol ganhou visibilidade apenas nas décadas de 1980 e 1990 (ZHAO; BAI, 2009).

Leveduras floculantes são linhagens de leveduras selecionadas que desempenham papel diferenciado no processo de obtenção do álcool devido a capacidade de se aderirem umas às outras formando agregados celulares. A utilização de leveduras floculantes na produção do bioetanol permite a eliminação da etapa de centrifugação, uma vez que estas leveduras decantam na ausência de açúcares fermentescíveis. Estas leveduras, após transformarem os açúcares presentes no meio em álcool, se agregam em forma de flocos e concentram-se no fundo do reator (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

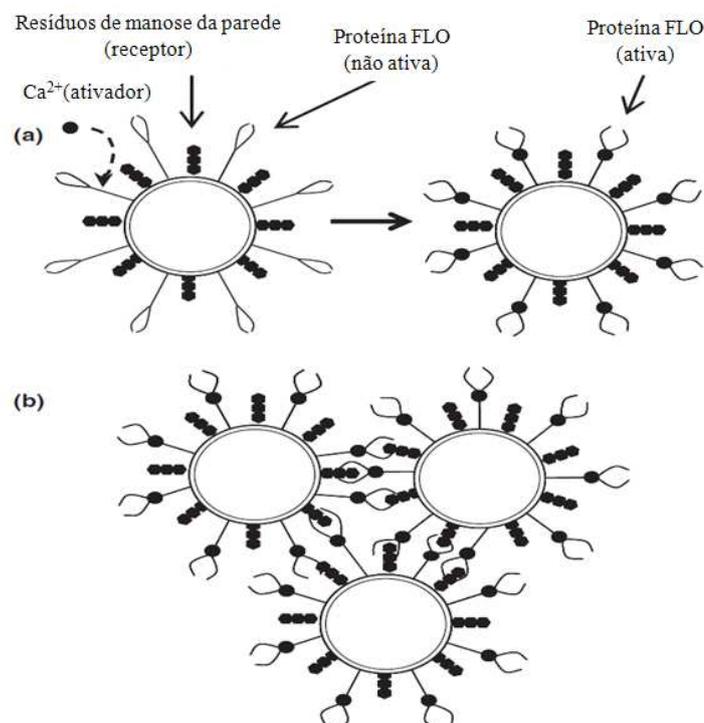
A floculação de leveduras é definida como uma agregação não sexuada, reversível e dependente de cálcio para formação de flocos que sedimentam rapidamente em meio líquido de crescimento (STRATFORD, 1988). A floculação e aderência das leveduras ocorrem devido à presença de proteínas especiais na superfície celular, que são codificadas pelo gene FLO. Estas proteínas recebem o nome de floculinas ou adesinas e estão presentes na parede celular

apresentando diferentes propriedades de ligação à carboidratos específicos (ZHAO; BAI, 2009).

Para explicar o mecanismo envolvido na floculação Miki et al. (1982) propuseram um modelo no qual as células apresentam um fator de reconhecimento. Na teoria “*lectin-like theory of flocculation*” sugere-se que as proteínas de superfícies das leveduras floculantes funcionem como lectinas, as quais se ligam, então, às mananas, carboidratos presentes na parede celular. Tal estudo mostrou a presença de interações extensas e intensas entre as mananas e lectinas. Além disso, Miki et al. (1982) sugeriram que os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , das próprias células, atuam como cofatores na manutenção da conformação ativa das proteínas da superfície, aumentando assim a capacidade das lectinas para interagir com carboidratos de  $\alpha$ -manano (Figura 3.2) (SOARES, 2010).

Embora as lectinas tenham sido claramente demonstradas como envolvidas em floculação, ainda não está claro como lectinas e ligantes interagem especificamente (BAUER; GOVENDER; BESTER, 2010).

**Figura 3.2-** Mecanismo da teoria da lectina na floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: (a) íons de cálcio permitem que as lectinas alcancem sua conformação ativa e (b) as lectinas ativam a floculação.



Fonte: Soares (2010).

Liu et al. (2012) utilizaram leveduras floculantes na fermentação em batelada com altas concentrações de glicose de  $201 \pm 3,1$  g/L (HG) e  $252 \pm 2,9$  g/L (VHG). Os autores observaram que a floculação da levedura forneceu uma proteção para as células se adaptarem à rápida mudança de ambiente após inoculação no meio HG e VHG, conseqüentemente nenhuma fase lag foi observada no processo. Quando foi aplicado o controle do potencial redox, os pesquisadores verificaram que a mudança morfológica associada à floculação e o microambiente criado dentro dos flocos de levedura atenuaram a flutuação do potencial redox em comparação à fermentação alcoólica com levedura não floculante. Os metabólitos são ocluídos dentro dos flocos formados evitando sua liberação no caldo de fermentação, beneficiando o processo.

Ali e Zulkali (2013) observaram que a utilização de leveduras floculantes na produção de etanol, por processo contínuo, provocou um impacto significativo, a floculação pareceu reduzir a lavagem de células.

Tofalo et al. (2014), em um estudo comparativo, entre cepas de leveduras floculantes e não floculante, verificaram que a floculação conferiu uma maior resistência ao estresse pelo etanol, dessa forma, a floculação protege células que expressam FLO1 de ambientes estressantes.

Santos et al. (2015) estudaram o comportamento da *Saccharomyces cerevisiae* de característica floculante em relação ao pH inicial do meio de fermentação, concluindo que o pH influencia fortemente o comportamento floculante da levedura, em valores de pH de 4,0 o meio tornou-se opaco e viscoso. Para fermentação iniciada em pH 5,0, maior rendimento e produtividade foram observados, e não houve desfloculação da levedura no final do processo.

### **3.7 Cinética da fermentação alcoólica**

A cinética de processos microbianos tem como objetivo quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados. Além disso, o estudo permite o melhor entendimento de como fatores externos, como pH, temperatura e inibidores, afetam essas taxas (VIEGAS, 1999).

Os modelos cinéticos de processos fermentativos recebem classificações em dois tipos: quanto ao número de componentes usados na representação celular e quanto à heterogeneidade da população microbiana.

Quanto ao número de componentes usados na representação celular podem ser divididos em:

- Modelos não estruturados: o material celular é representado por uma única variável, a massa celular ou o número de células, por exemplo, desprezando variações nos componentes intracelulares;

- Modelos estruturados: as células são descritas considerando os componentes intracelulares, o estado das células e sua adaptação ao meio ambiente.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana os modelos cinéticos são classificados em:

- Modelos não segregados: o comportamento da população celular é considerado homogêneo.

- Modelos segregados: a população celular é heterogênea, apresentando distribuição de idade, tamanho e de propriedades celulares (BONOMI; SHMIDELL, 2001; SOUZA, 2013).

Neste contexto os modelos cinéticos utilizados para descrever a atividade microbiana, segundo Bailey e Ollis (1986), podem ser divididos em quatro grupos: não-estruturados e não-segregados, nos quais as células são consideradas como soluto monocomponente; estruturados e não-segregados, onde as células são tratadas como indivíduos multicomponentes com composição média semelhante; não-estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, descritos por um único componente; e estruturados e segregados, nos quais as células de microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes. No estudo da fermentação alcoólica, o modelo não-estruturado e não-segregado é o mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas (VIEGAS, 1999).

Os modelos não-estruturados e não-segregados se baseiam na determinação da velocidade específica de crescimento do microrganismo ( $\mu$ ) ou da produção de etanol pelo decréscimo da velocidade específica máxima por meio dos termos de inibição ou limitação (ANDRIETTA, 1994).

A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod (Equação 3.1), que expressa a velocidade específica de crescimento do microrganismo ( $\mu$ ) como uma função da concentração de substrato limitante (S).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad (3.1)$$

Em que  $\mu_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxíma de crescimento e  $K_s$  é a constante de Monod, que representa o valor de S no qual a taxa específica de crescimento é a metade do seu valor máxímo (BONOMI; SHMIDELL, 2001). Entretanto, a equação de Monod somente é aplicável quando não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura, ou quando estes estão presentes em quantidades que não afetem a taxa de crescimento celular (VIEGAS, 1999).

A taxa específica de crescimento pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como substratos ou produtos formados. O etanol começa a ter efeito inibitório na taxa de crescimento a partir de 15 g/L (PACHECO, 2010).

Levenspiel (1980) descreveu um modelo para o crescimento celular contendo um termo para inibição pelo produto, além de considerar o efeito do substrato limitante ( $K_s$ ). Han e Levenspiel (1988) incluíram o termo de inibição pelo substrato, onde  $m$  é a potência do termo de inibição pelo substrato (Equação 3).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \left(1 - \frac{S}{S_{m\acute{a}x}}\right)^m \quad (3.2)$$

Na qual  $P_{m\acute{a}x}$  é a concentração limite do produto inibidor.

No modelo cinético de Ghose e Thyagi (1979) é considerado o efeito do substrato limitante, a inibição pelo substrato e a inibição pelo produto (Equação 3.3).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_{IS}}} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right) \quad (3.3)$$

O modelo de Tosetto (2002), de acordo com a Equação (3.4), apresenta um expoente no termo de inibição pelo produto, o qual pode assumir valores diferentes de um.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_{IS}}} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n \quad (3.4)$$

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

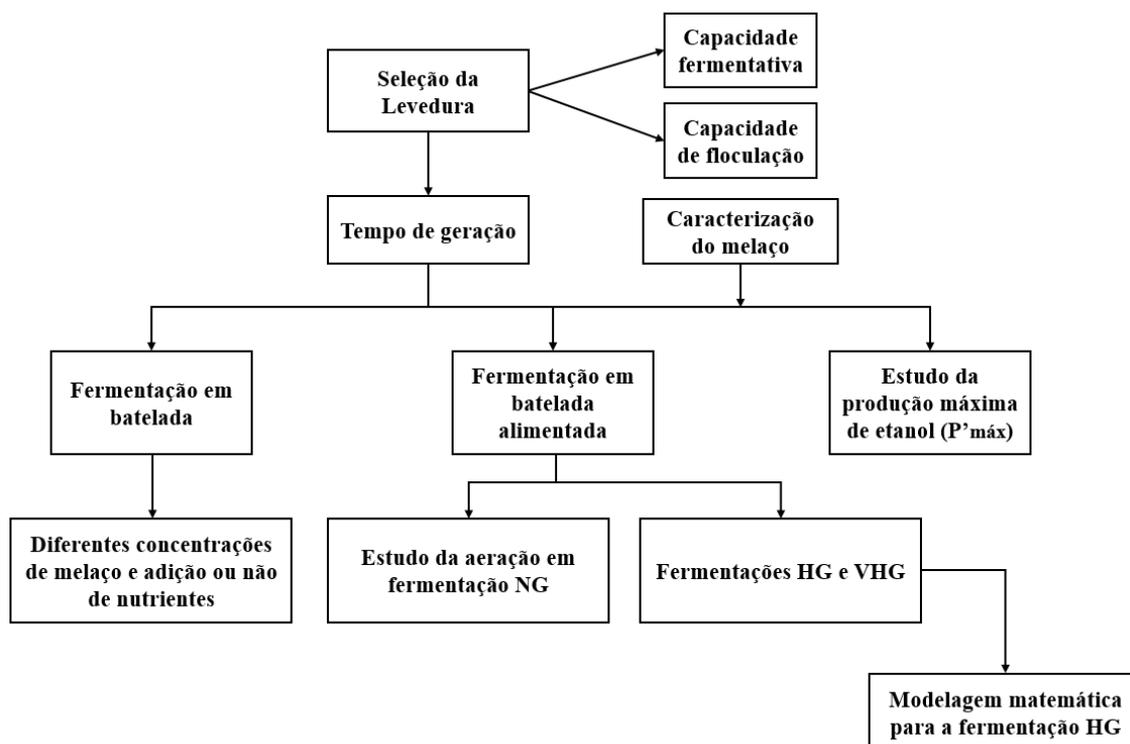
Guidini et al. (2014) utilizaram o modelo cinético de Tosetto (2002) para descrever a inibição da cinética de fermentação alcoólica em batelada alimentada pelo substrato e pelo produto. A velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) encontrada foi de  $0,103 \text{ h}^{-1}$ , e as constante de saturação ( $K_S$ ) e de inibição ( $K_{IS}$ ) foram  $30,24 \text{ g/L}$  e  $109,86 \text{ g/L}$ , respectivamente, obtendo um bom ajuste ao modelo.

Pinheiro et al. (2017) conseguiram descrever com precisão a dinâmica de produção de etanol por *S. cerevisiae* CCA008 floculante crescendo em suco de caju utilizando o modelo de Ghose e Tyagi (1979), obtendo  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $K_S$  e  $K_{IS}$  iguais a  $0,200 \text{ h}^{-1}$ ,  $23,59 \text{ g/L}$  e  $103,44 \text{ g/L}$ , respectivamente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 4.1 apresenta o fluxograma de todas as etapas realizadas neste trabalho a fim de facilitar a compreensão dos caminhos percorridos durante o estudo.

Figura 4.1 - Fluxograma representativo das etapas realizadas no trabalho.



### 4.1 Material

#### 4.1.1 Microrganismo e meio de cultura

As leveduras, utilizadas nesse trabalho, de características floculantes, *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, C2 1/00, C14 e C4 1/00 foram doadas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Campinas-SP. Estas foram mantidas em ultrafreezer com solução glicerol 20%. Além disso, as culturas foram mantidas nos estados sólido e líquido, em refrigerador, à  $7 \pm 1$  °C, e eram repicadas semanalmente em meio líquido e a cada 2 meses em meio sólido.

A composição do meio de cultura líquido para crescimento e repique das células foi composto por sacarose (125 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (2 g/L)

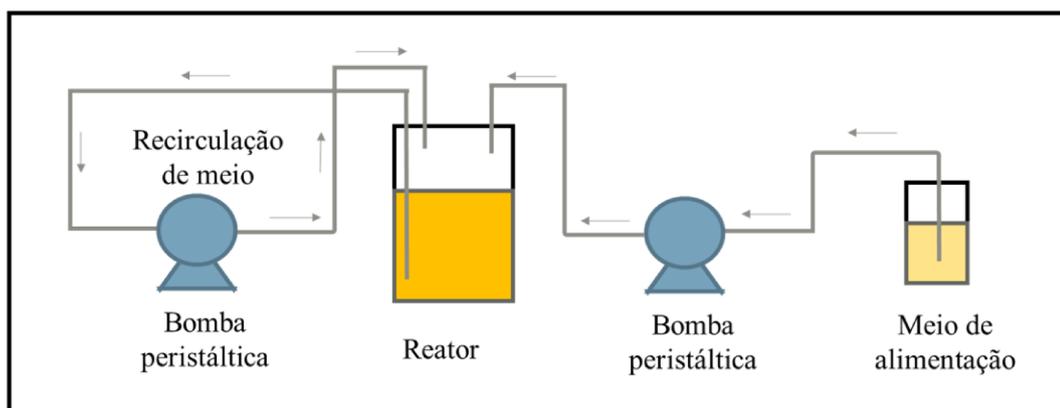
e extrato de levedura (6 g/L). Já no meio sólido foi utilizado os mesmos reagentes, entretanto com concentração de sacarose 100 g/L e concentração de ágar-ágar de 30 g/L (PACHECO, 2010). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção da sacarose, a qual foi substituída pelo açúcar cristal comercial.

As fermentações foram realizadas utilizando meios a partir de melaço de cana-de-açúcar doado pela empresa Usina Uberaba S.A., localizada em Uberaba – MG.

#### 4.1.2 Unidade experimental

As fermentações em batelada alimentada foram realizadas no biofermentador (TECNAL TEC BIO PLUS) com volume útil de 1.200 mL, sendo este volume utilizado nas fermentações. A Figura 4.2 apresenta esquematicamente a unidade de trabalho e a Figura 4.3 apresenta o fermentador operando em batelada alimentada.

Figura 4.2- Unidade de trabalho.



Fonte: Autora.

Os experimentos foram realizados sem agitação mecânica. A temperatura foi mantida à  $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$  e o pH do meio foi ajustado em 4,5 apenas no início de cada fermentação com a adição de HCl 2N. A alimentação do meio de cultura e a recirculação de meio foi realizada por uma bomba peristáltica, com vazão controlada. A aeração foi realizada com uma bomba de 6 W (Maxxi Compressor PRO-9000) e a vazão de ar foi controlada com o auxílio de um anemômetro, o qual mediu a velocidade do ar. A partir do valor da área do orifício do reator onde foi inserida a aeração, a taxa de aeração foi definida em volume de ar por volume de meio fermentado por minuto (vvm). Para o controle da espuma formada durante a fermentação foi

utilizado o antiespumante ENG450, doado pela empresa Bevap, localizada em João Pinheiro - MG.

**Figura 4.3-** Fermentador operando em batelada alimentada.



#### **4.1.3 Preparo do inóculo**

As culturas celulares foram repicadas do meio sólido para o meio sintético transferindo as células, com o auxílio de uma alça de platina, para o meio líquido contido em erlenmeyers de 125 mL. Estes foram mantidos em *shaker* à temperatura de 32°C e agitação controlada de 120 rpm por tempo aproximado de 24 horas. Após este período e a decantação das células, o sobrenadante foi descartado e um novo meio adicionado. Novamente as células foram incubadas em *shaker* por 24 horas. A troca de meio dos erlenmeyer foi realizada até obter quantidade suficiente de células para realização dos experimentos. À medida que o volume de células aumentou ocorreu o aumento do volume dos erlenmeyers utilizados.

## **4.2 Metodologias**

### **4.2.1 Métodos analíticos**

#### **4.2.1.1 Caracterização do melão de cana-de-açúcar**

Os metais cálcio, cobalto, ferro, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco presentes nas amostras de melão de cana-de-açúcar doado pela empresa Usina Uberaba, foram quantificados utilizando o espectrofotômetro de absorção atômica, marca Shimadzu, modelo AA-7000.

O nitrogênio total foi quantificado empregando a técnica de combustão catalítica com o aparelho analisador Total Organic Carbon Analyzer TOC-L CPH/CPN da Shimadzu.

A quantidade de sólidos solúveis em massa no melão foi quantificado utilizando o refratômetro analógico. Uma relação entre a quantidade de sólidos solúveis (°Brix) e açúcares redutores totais (ART) foi obtida por regressão linear de uma curva construída a partir da quantificação de ART em g/L e °Brix de soluções de melão em diferentes concentrações.

Para a quantificação de ART foram determinadas as concentrações dos açúcares sacarose, glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência. A sacarose foi convertida em ART considerando que 1 g de sacarose é equivalente a 1,053 g de ART, então as concentrações destes açúcares foram somadas.

Os ácidos orgânicos, hidroximetilfurfural e furfural foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras foram diluídas, filtradas e injetadas no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, modelo LC-20A Prominence, com coluna Supelcogel C-610H, equipado com detector de índice de refração e ultra violeta. A leitura do ácidos orgânicos ocorreu em um comprimento de onda de 210 nm. A fase móvel utilizada foi o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) 0,1% na vazão de 0,5 mL/min e a temperatura do forno foi de 32°C.

#### **4.2.1.2 Análise das concentrações de açúcares e álcool por cromatografia líquida de alta eficiência**

As concentrações de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e etanol foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em todas as fermentações. O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária.

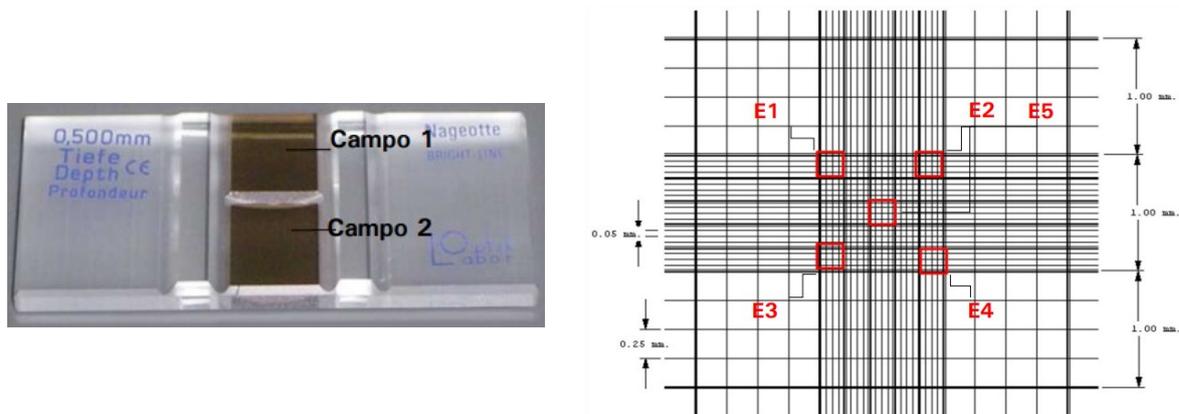
A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, modelo LC-20<sup>a</sup> Prominence, com coluna Supelcogel K, na qual os componentes são separados, além disso, utilizou-se um detector de índice de refração. A fase móvel utilizada foi o fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) 15 mmolar na vazão de 0,5 mL/min e a temperatura do forno foi de 85°C.

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

A concentração celular e a viabilidade celular foram realizadas por contagem em câmara de Neubauer. As amostras foram retiradas do reator, diluídas com solução 5 mM de EDTA em tampão citrato pH 3 e mantidas nestas condições por 30 minutos para desfloculação das células, para possibilitar a contagem das mesmas (MATSUMOTO et al., 2002). A técnica de coloração com azul de metileno consiste em se misturar 5 mL da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e duas gotas da solução corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentar-se-ão coloridas de azul.

A contagem é realizada transferindo-se, com uma pipeta de Pasteur, a amostra para a câmara de Neubauer para, então, ser visualizada no microscópio com aumento total de 400X. A contagem de leveduras foi realizada nos campos 1 e 2 da câmara de Neubauer nos cinco quadrantes (E1, E2, E3, E4 e E5), representados na Figura 4.4. Posteriormente, o número de células por mL foi determinado pela Equação (4.1) (EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2012). A viabilidade celular ou porcentagem de células viáveis foi determinada pela razão das células viáveis pelo total de células.

Figura 4.4 - Câmara de Neubauer e posição dos quadrantes.



Fonte: Embrapa Meio Ambiente, 2012.

$$\frac{C_{\text{él}}}{\text{mL}} = \left( \frac{C1 + C2}{2} \right) \cdot 2,5 \times 10^5 \cdot \text{Diluição} \quad (4.1)$$

Onde C1 e C2 são as médias das contagens dos cinco quadrantes de cada campo.

## 4.2.2 Metodologia experimental

### 4.2.2.1 Seleção da levedura

Foram realizados dois experimentos com o intuito de selecionar, dentre as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, C2 1/00, C14 e C4 1/00, a mais apta para o processo de fermentação alcoólica utilizando meio à base de melaço. Os parâmetros avaliados nestes experimentos foram a capacidade fermentativa e a capacidade de floculação.

#### 4.2.2.1.1 Capacidade fermentativa

A capacidade fermentativa é um sistema de classificação de leveduras que leva em consideração as características cinéticas, de rendimento e produtividade das linhagens.

Para determinação da capacidade fermentativa, os experimentos foram realizados em *shaker*, com controle de temperatura a 32°C e agitação de 150 rpm. O volume inicial de células foi igual a 10% (v/v), de forma que a concentração inicial de células foi igual a 10<sup>8</sup> células/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada cepa, em frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo estéril composto por: sacarose (150 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 g/L),

MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (1 g/L), [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). O pH do meio foi corrigido para 4,5 com adição de ácido clorídrico 2N. No tempo 0 h e após o tempo de incubação de 24 h, foram analisados o teor de açúcares redutores totais, de etanol e a concentração celular por contagem em câmara de Neubauer.

Neste sistema de classificação, foram utilizados seis parâmetros para comparação entre as cepas, sendo eles: rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ), velocidade de consumo de sacarose (VCS), nível de conversão de substrato (NCO), produtividade ( $\emptyset$ ) e coeficiente de rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) e velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) (ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999; STECKELBERG, 2001).

### **Rendimento celular ( $Y_{x/s}$ )**

O rendimento celular é determinado pela razão entre o número de células produzida e a massa de açúcares redutores totais consumida (g) (Equação 4.2).

$$Y_{x/s} = \frac{MK}{MS} \quad (4.2)$$

Onde,

$Y_{x/s}$  = Rendimento celular (Cél/g<sub>substrato</sub>);

$MK$  = Quantidade celular produzida (cél);

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

### **Velocidade de consumo de substrato (VCS)**

Expressa a massa de substrato consumido (g) por volume de meio em fermentação (L) por unidade de tempo (h) (Equação 4.3). Este parâmetro fornece a velocidade com que a cepa de levedura consome o açúcar disponível.

$$VCS = \frac{MS}{V_m \cdot t_f} \quad (4.3)$$

Onde,

VCS = Velocidade de consumo de substrato (g/(L·h));

$MS$  = Massa de ART consumida (g);

$V_m$  = Volume de meio (L);

$t_f$  = Tempo de fermentação (h).

### **Nível de conversão de açúcar (NCO)**

Este parâmetro expressa a quantidade de açúcares consumida em relação ao açúcar inicial (Equação 4.4). Ele indica a afinidade do microrganismo com o substrato, ou seja, a capacidade do microrganismo de crescer em baixas concentrações de açúcares.

$$NCO = \frac{MS_i - MS_f}{MS_i} \cdot 100 \quad (4.4)$$

Onde,

NCO = Nível de Conversão de ART (%);

MS<sub>i</sub> = Massa de ART inicial (g);

MS<sub>f</sub> = Massa de ART final (g).

### **Produtividade (Ø)**

Expressa a massa de etanol produzida (g) por volume (L) de meio em fermentação por unidade de tempo (h) (Equação 4.5). Este parâmetro permite determinar a velocidade de transformação do açúcar em etanol.

$$\emptyset = \frac{ETOH}{V_m \cdot t_f} \quad (4.5)$$

Onde,

Ø = Produtividade (g/(L·h));

ETOH = Massa de etanol (g);

V<sub>m</sub> = Volume de meio (L);

t<sub>f</sub> = Tempo de fermentação (h).

### **Coefficiente de rendimento em etanol (Y<sub>p/s</sub>)**

Expressa a massa de etanol produzida em relação à massa de ART consumida. (Equação 4.6). Este parâmetro indica o rendimento em álcool que a cepa de levedura alcança.

$$Y_{p/s} = \frac{ETOH}{MS} \quad (4.6)$$

Onde,

Y<sub>p/s</sub> = Coeficiente de rendimento em etanol em relação ao açúcar consumido (g de etanol/g de ART);

ETOH = Massa de etanol (g);

$M_S$  = Massa de ART consumida (g).

Com os resultados dos parâmetros analisados no estudo da capacidade fermentativa, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) para avaliação das médias obtidas, utilizando o *software* STATISTICA<sup>®</sup> 7.0.

#### 4.2.2.1.2 Capacidade de floculação

Os ensaios de floculação, realizados com as quatro cepas C2/00, C2 1/00, C4 1/00 e C14 basearam-se na quantificação de células em suspensão no decorrer do tempo. A metodologia utilizada foi descrita por Gomes et al., 2012.

Antes da realização do teste de floculação foi realizada uma fermentação à temperatura ambiente, em mesa agitadora (150 rpm) por 13 horas em erlenmeyer de 250 mL. Utilizou-se 100 mL de meio composto por: sacarose (100 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L) e 4% de concentração celular. Em seguida o ensaio foi realizado em triplicata.

Para avaliação da capacidade de floculação da levedura retirou-se 25 mL do meio fermentado. Centrifugou-se a amostra, descartou-se o sobrenadante e posteriormente as células de levedura foram lavadas duas vezes com solução desfloculadora de NaCl 15 g/L (pH 3) e recuperadas por centrifugação. As células resultantes da última lavagem foram transferidas para um cilindro de 25 mL e o volume foi completado com solução desfloculadora. Em seguida, 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  100 mM foi adicionado para induzir a floculação. Agitou-se a mistura e amostras de 40  $\mu\text{L}$  foram retiradas do mesmo nível do cilindro de 2 em 2 minutos até totalizar o tempo de 10 minutos. As amostras foram diluídas até completar 2 mL e foi realizada a leitura da 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 em relação ao controle para cada ponto de amostragem.

#### 4.2.2.2 Tempo de geração

Com o objetivo de conhecer melhor as características de crescimento da cepa selecionada foi determinado o tempo de geração. O experimento foi realizado em triplicata, em erlenmeyers de 250 mL sendo adicionados 0,5 g de decantado celular (obtido por sedimentação) juntamente com 100 mL de meio sintético: sacarose (100 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

(1 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). A concentração inicial de células foi  $9 \cdot 10^6$  cel/mL. Os erlenmeyers foram colocados em *shaker* com controle de temperatura (32°C) e agitação (150 rpm) por 3 horas. A cada 30 minutos 1 mL do meio foi retirado e diluído 10 vezes com solução 5 mM de EDTA, em tampão citrato, pH 3, para contagem de células em câmara de Neubauer.

A velocidade específica de crescimento e o tempo de geração foram calculados a partir da curva de crescimento do número de células viáveis *versus* tempo. A velocidade específica de crescimento está relacionada com o coeficiente angular da equação linear do logaritmo natural do número de leveduras ( $\ln X$ ) em função do período de fermentação ( $t$ ), a qual foi determinada pela regressão linear.

Sendo a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) dada pela Equação 4.7.

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4.7)$$

Onde X representa a concentração de leveduras e t o tempo em horas. Como o tempo de geração ( $t_g$ ) é o tempo necessário para duplicação da população celular, então  $X=2X_0$ , logo o tempo de geração é dado pela Equação 4.8 (HISS, 2001).

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4.8)$$

#### **4.2.2.3 Fermentação em batelada com meio à base de melão com e sem adição de nutrientes**

Inicialmente foram realizadas algumas fermentações com a intenção de verificar o comportamento da cepa escolhida em meios com diferentes concentrações de melão. Baseado no estudo de Santos (2014), onde a utilização de concentrações de melão acima de 40% v/v resultou na dissolução dos flocos formados pelas leveduras floculantes, determinou-se a faixa de concentrações de melão na composição de cada meio utilizado.

As fermentações, realizadas em triplicata, foram conduzidas em *shaker*, à 32°C e 150 rpm por um período de 18 h, com 18% de célula decantada. O meio de fermentação foi composto por solução de melão de cana-de-açúcar nas concentrações de 13,6; 16,4; 20,5; 24,6 e 30% v/v, que correspondem às concentrações de 134,5, 164,8, 191,9 e 244,5 g/L de ART,

respectivamente, em dois grupos de experimentos, com e sem suplementação com os seguintes sais:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L). A definição das concentrações de sais foi baseada na composição do meio líquido para crescimento celular, proposta por Pacheco (2010).

O pH do meio foi corrigido para 4,5 com adição de ácido clorídrico 2N. Nos tempos iniciais e em 18 h de fermentação foram retiradas amostras para determinação dos teores de açúcares (sacarose, frutose e glicose), etanol e concentração celular.

#### **4.2.2.4 Fermentação em batelada alimentada utilizando melão de cana-de-açúcar**

Baseado nas eficiências obtidas na fermentações em batelada, novas fermentações foram conduzidas em batelada alimentada com concentrações moderadas e altas de açúcares redutores totais. As condições das fermentações, assim como o preparo do inóculo, foram baseadas no estudo de Guidini et al. (2014) com algumas modificações de acordo com experimentos preliminares. Durante todo o processo utilizou-se recirculação de meio, no qual a bomba retirava meio do fundo do reator e o retornava pela sua tampa com o intuito de promover uma melhor homogeneização. A temperatura foi mantida constante em 32°C. O meio de fermentação utilizado foi à base de melão de cana-de-açúcar. O pH do inóculo e do meio de alimentação foram corrigidos para 4,5 com ácido clorídrico 2N. Para o controle da espuma formada durante a fermentação utilizou-se antiespumante, quando necessário.

As fermentações vinculadas a este item adotaram as seguintes condições de processo:

- Concentração de inóculo no reator: 30% (v/v);
- Tempo de enchimento: 6 h;
- Vazão de alimentação do substrato: 0,140 L/h;
- Vazão de recirculação: 39,12 L/h.

##### **4.2.2.4.1 Estudo da aeração em fermentação NG com melão e levedura floculante**

Para verificar a influência da aeração no rendimento da fermentação alcoólica em batelada alimentada utilizando melão de cana-de-açúcar foram realizadas duas fermentações nas mesmas condições, sendo que em uma delas foi incluída uma aeração de 0,2 vvm (volume de ar por volume de meio fermentado por minuto) durante todo o processo. A taxa de aeração foi determinada baseado no estudo de Arshad et al. (2017) e Rivera et al. (2017).

O inóculo consistiu de 220 mL de decantado celular adicionados de 140 mL de solução de melão contendo 155 g/L de ART, totalizando 360 mL. Durante 6 horas o sistema foi alimentado com meio a base de melão com concentração de 200 g/L de ART até o reator atingir um volume de 1.200 mL. O total de ART adicionado ao sistema foi, em média, de 164 g/L. O tempo total de fermentação foi de 12 h.

#### **4.2.2.4.2 Análise das fermentações HG e VHG utilizando melão com leveduras floculantes**

Foram realizadas fermentações em batelada alimentada em concentrações HG e VHG de açúcares presentes no melão. Inicialmente foi realizada uma fermentação preliminar, na qual o inóculo consistiu de 220 mL de decantado celular adicionados de 140 mL de solução de melão contendo 285 g/L de ART, totalizando 360 mL. Durante 6 horas o sistema foi alimentado com meio à base de melão (285 g/L de ART) até o reator atingir um volume de 1.200 mL. O total de ART adicionado ao sistema foi de 234 g/L. O tempo total da fermentação foi de 12 h.

Posteriormente foram realizadas as fermentações 1, 2 e 3, as quais apresentaram concentrações de açúcares redutores no meio de alimentação e o tempo de fermentação específicos para cada experimento. O inóculo consistiu de 220 mL de decantado celular adicionados de 140 mL de solução de melão contendo 155 g/L de ART, totalizando 360 mL. Durante 6 horas o reator foi alimentado com meio à base de melão nas concentrações de 271, 290 e 331 g/L de ART para as fermentações 1, 2 e 3, respectivamente. O tempo total do processo para as fermentações 1, 2 e 3 foi de 30, 33 e 36 horas, apresentados na Tabela 4.1. As condições do processo das três fermentações foram:

**Tabela 4.1** - Condições das fermentações em batelada alimentada.

<b>Fermentação</b>	<b>Tempo total de fermentação (h)</b>	<b>Concentração da solução de alimentação (g/L de ART)</b>	<b>ART total adicionado (g/L)</b>
1	30	271	209
2	33	290	222
3	36	331	250

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

O objetivo da determinação de  $P'_{\text{máx}}$  foi quantificar a concentração máxima de etanol que a levedura C2/00 seria capaz de alcançar durante o processo fermentativo até a inibição total pelo produto, ou seja, não haver mais produção de etanol nem consumo de açúcar. O ensaio foi realizado em reator com volume útil de 1.200 mL, iniciando em batelada com um volume de 800 mL, com concentração celular de 18% (v/v) e concentração de melão de 29% (v/v), que corresponde à 189,6 g/L de ART (GUIDINI et al., 2014). A recirculação de meio foi realizada durante todo o processo. Quando a concentração de açúcares redutores totais (ART) atingiu valores menores que 10 g/L (13,35 h) foi adicionado ao reator 0,1 L de solução de melão com concentração de 450 g/L de ART e, posteriormente, no tempo 22,5 h, mais 0,1 L de solução de melão com concentração de 500 g/L de ART foi adicionado.

#### **4.2.2.6 Cinética da fermentação alcoólica em batelada alimentada**

O modelo cinético escolhido para descrever o comportamento cinético da fermentação 2 foi o modelo de Ghose e Thyagi (1979) modificado por Tosetto (2002), baseado no trabalho de Guidini et al. (2014) que utilizaram este modelo para estimar os parâmetros cinéticos da fermentação em batelada alimentada de meio sintético pela cepa floculante C2/00. Sonogo e colaboradores (2016) também obtiveram excelentes ajustes utilizando este modelo para descrever o comportamento cinético na fermentação em batelada alimentada para produção de etanol.

##### **4.2.2.6.1 Modelagem matemática da batelada alimentada**

A fermentação em batelada alimentada é conduzida em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a alimentação do mosto ocorrendo variação do volume do reator ( $V$ ) de acordo com a vazão de alimentação ( $F$ ). Produzindo etanol as células atendem suas necessidades de energia para crescimento e manutenção. A manutenção celular é a energia requerida para apoiar funções celulares como reparos, síntese de proteínas, entre outros (RIVERA et al., 2017). Considerando a geração de produto associada e não associada ao crescimento celular e a contribuição de substrato para o crescimento e manutenção celular, o balanço de massa para células ( $X$ ),

substrato (S) e etanol (P) na fermentação batelada alimentada pode ser descrito pelas Equações 4.9, 4.10 e 4.11.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - X \frac{F}{V} \quad (4.9)$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_a - S) \frac{F}{V} - \frac{1}{Y_{x/s}} \mu X - m_s X \quad (4.10)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \mu X + m_p X - P \frac{F}{V} \quad (4.11)$$

Onde:

$X$  = Concentração celular (células viáveis/L);

$\mu$  = taxa específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ );

$S$  = concentração de açúcares redutores totais no reator (g/L);

$S_a$  = Concentração de açúcares redutores totais na alimentação (g/L);

$Y_{x/s}$  = coeficiente de rendimento celular (cél/g<sub>s</sub>);

$Y_{p/s}$  = coeficiente de rendimento em etanol em relação ao açúcar consumido (g<sub>e</sub>/g<sub>s</sub>);

$m_s$  = constante de manutenção celular (g/(cél.h));

$m_p$  = constante de produção de etanol não associado ao crescimento (g/(cél.h));

$P$  = concentração de etanol (g/L).

Finalizada a alimentação inicia-se a segunda etapa, onde o processo fermentativo continua até que todos os açúcares sejam consumidos ou não ocorra mais formação de etanol. Assim  $F$  é igual a zero e então o balanço de massa para células ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e etanol ( $E$ ) é descrito por uma batelada convencional, de acordo com as equações 4.12, 4.13 e 4.14.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4.12)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \mu X - m_s X \quad (4.13)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \mu X + m_p X \quad (4.14)$$

O modelo cinético utilizado neste trabalho foi o modelo de Ghose e Thyagi (1979) modificado por Tosetto (2002), descrito pela Equação 4.15.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_{IS}}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n \quad (4.15)$$

Onde:

$\mu_{m\acute{a}x}$  = taxa específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ );

$K_s$  = constante de saturação para o crescimento celular (g/L);

$K_{IS}$  = constante de inibição do crescimento celular pelo substrato (g/L);

$P_{m\acute{a}x}$  = concentração máxima de etanol quando cessa o crescimento celular (g/L);

$n$  = constante adimensional, potência do termo de inibição pelo produto.

Os coeficientes de rendimento celular e de etanol foram determinados por meio das Equações 4.16 e 4.17.

$$Y_{x/s} = \frac{X_f V_f - X_0 V_0}{(V_f - V_0) S_a - S_f V_f + S_0 V_0} \quad (4.16)$$

$$Y_{p/s} = \frac{P_f V_f - P_0 V_0}{(V_f - V_0) S_a - S_f V_f + S_0 V_0} \quad (4.17)$$

Os subscritos 0 e f indicam inicial e final, respectivamente.

#### 4.2.2.6.2 Ajuste matemático dos parâmetros cinéticos

Depois de determinados os parâmetros  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$  e  $P_{m\acute{a}x}$  os parâmetros cinéticos foram estimados utilizando o método de regressão não linear de Nelder e Mead (1965). O método numérico para resolução das equações diferenciais do modelo foi o Runge-Kutta (GILL, 1951). A minimização da soma dos quadrados dos resíduos foi utilizada como critério para melhor ajuste e otimização dos parâmetros. As resoluções numéricas foram implementadas no Scilab-6.0.1.

### 4.2.3 Cálculo de rendimento, produtividade e eficiência da fermentação alcoólica

O rendimento em etanol foi calculado em relação ao etanol produzido pelo total de açúcar redutor (ART) adicionado utilizando o melaço de cana-de-açúcar. Para expressar o rendimento da produção de etanol em porcentagem (Equação 4.18) considerou-se o rendimento teórico de 0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>ART</sub> como 100%.

$$Rend(\%) = \frac{\left( \frac{P_f V_f - P_0 V_0}{(V_f - V_0) S_a + S_0 V_0} \right)}{0,511} \times 100 \quad (4.18)$$

Onde,

$S$  = Concentração de açúcares redutores totais no reator (g/L);

$S_a$  = Concentração de açúcares redutores totais na alimentação (g/L);

$P$  = concentração de etanol no reator (g/L).

$V$  = volume do reator;

Os subscritos 0 e f indicam inicial e final, respectivamente.

A produtividade foi calculada em relação ao etanol produzido pelo tempo total de fermentação (Equação 4.19).

$$\emptyset = \frac{P_f V_f - P_0 V_0}{V_f} \cdot \frac{1}{t} \quad (4.19)$$

Onde,

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

$t$  = tempo de fermentação (h).

A eficiência da fermentação alcoólica foi calculada em relação ao etanol produzido pelo total de açúcar redutor (ART) consumido. Para expressar o rendimento da produção de etanol em porcentagem (Equação 4.20) considerou-se o rendimento teórico de 0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>ART</sub> como 100%.

$$\varepsilon_{P/ART} = \frac{\left( \frac{P_f V_f - P_0 V_0}{(V_f - V_0) S_a - S_f V_f + S_0 V_0} \right)}{0,511} \times 100 \quad (4.20)$$

Onde,

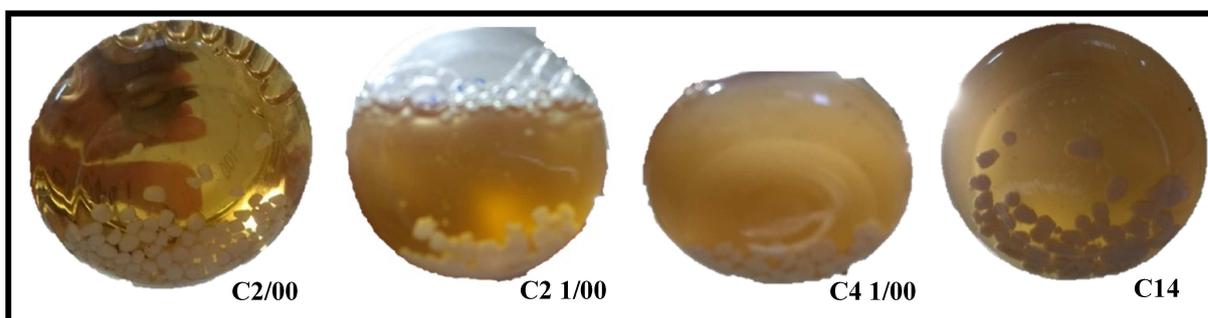
$\varepsilon_{P/ART}$  = Eficiência da fermentação alcoólica (%);

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção da Levedura

A utilização do teste da capacidade fermentativa permitiu selecionar a cepa, dentre as quatro cepas estudadas, que apresentou melhores resultados dos parâmetros analisados. Ele é importante principalmente para detectar diferenças no rendimento e produtividade de cada cepa. Já o estudo da capacidade de floculação da levedura permitiu avaliar as características de sedimentação de cada cepa. Apesar de todas as cepas apresentarem características floculantes, elas apresentam diferenças na formação de flocos, o que, conseqüentemente, interfere no tempo de decantação de cada célula. As Figura 5.1 e 5.2 apresentam o comportamento de cada cepa em meio de crescimento. Verificou-se que os quatro tipos de células formaram flocos definidos. Os meios apresentaram determinada turbidez, apenas com a C2/00 ele ficou totalmente translúcido após o consumo dos açúcares.

**Figura 5.1** - Formação de flocos em meio de crescimento.



**Figura 5.2** - Comportamento das cepas floculantes em meio de crescimento.



### 5.1.1 Capacidade Fermentativa

A Tabela 5.1 apresenta os parâmetros obtidos relativos à capacidade fermentativa para cada cepa estudada de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabela 5.1** - Parâmetros cinéticos obtidos para cada cepa.

Parâmetro	C2/00	C2 1/00	C14	C4 1/00
$Y_{p/s}$ (g <sub>et</sub> /g <sub>art</sub> )	0,45± 0,04 (a)	0,40±0,03 (a)	0,41±0,01 (a)	0,41±0,01 (a)
PROD (g <sub>et</sub> /L.h)	2,80± 0,20 (a)	2,86±0,18 (a)	3,06±0,17 (a)	2,86±0,05 (a)
VCS (g <sub>art</sub> /L.h)	6,25± 0,15 (b)	7,06±0,15 (a)	7,44±0,37 (a)	7,00±0,03 (a)
NCO (%)	99,11± 0,09 (a)	99,21±0,16 (a)	99,14±0,02 (a)	99,23±0,15 (a)
$Y_{x/s}$ (cel/g <sub>art</sub> )	1,20E+08± 9,63E+07 (a)	8,75E+07± 7,60E+07 (a)	1,51E+08± 1,92E+07 (a)	1,39E+08± 6,58E+07 (a)

Tratamentos seguidos de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey, com  $\alpha=5\%$ .  $Y_{p/s}$ : coeficiente de rendimento em etanol; PROD: produtividade; VCS: velocidade de consumo de substrato; NCO: nível de conversão de açúcar;  $Y_{x/s}$ : rendimento celular.

As cepas C2/00, C2 1/00, C14 e C4 1/00 apresentaram coeficiente de rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) e produtividade que não diferiram estatisticamente. Segundo Migliari (2001) quanto maiores os parâmetros de produtividade e rendimento melhor será a levedura para o processo. As quatro cepas apresentaram excelente nível de conversão de substrato (NCO), evidenciando alta afinidade das leveduras com o substrato e seu poder de crescer em baixas concentrações de açúcares. Da mesma forma, o rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ) das quatro cepas foi similar, a C2 1/00 apresentou o menor rendimento celular, indicando menor desvio de açúcar para a produção de células. Maior variação entre os resultados foi encontrada para velocidade de consumo de substrato (VCS), sendo a menor velocidade encontrada para a cepa C2/00.

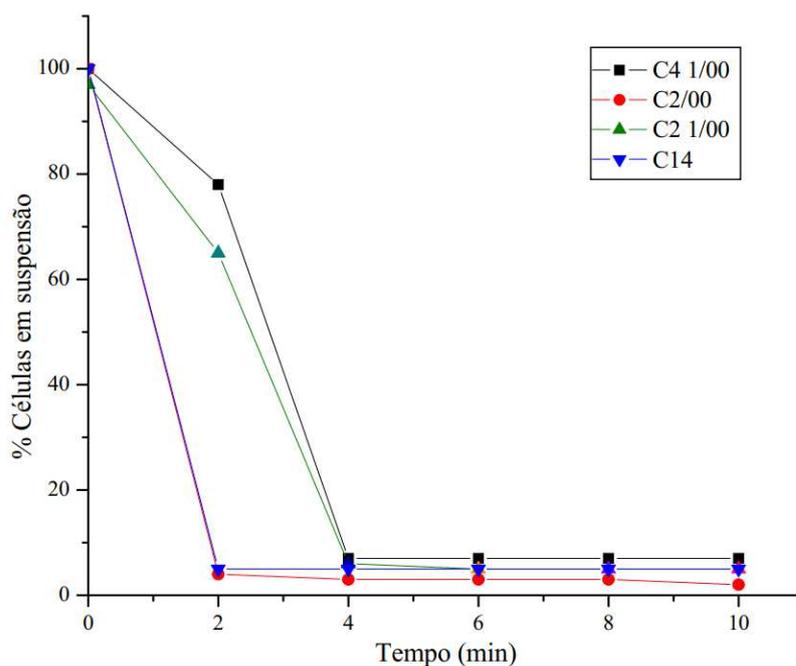
Realizando a análise de variância entre as cepas estudadas, para quase todos os parâmetros cinéticos, com exceção da VCS, as cepas não foram estatisticamente diferentes ao nível de 5% de significância. Realizando o teste de Tukey para o parâmetro VCS (Tabela 5.1), verificou-se que apenas a cepa C2/00 difere das demais, apresentando a menor VCS.

Santos (2014) e Guidini et al. (2014) estudaram a capacidade fermentativa de seis cepas floculantes, e da mesma forma a cepa C2/00 apresentou resultados satisfatórios. No entanto os resultados para coeficiente de rendimento da fermentação (0,50 g<sub>et</sub>/g<sub>sac</sub>) e produtividade (3,6 g<sub>et</sub>/L.h) foram maiores do que os obtidos neste trabalho. Este fato pode ser justificado pelo armazenamento da levedura, o qual pode ocasionar perda da atividade da levedura e também pela frequência da utilização das leveduras em outros processos, o que as tornam mais ativas devido à adaptação.

### 5.1.2 Capacidade de floculação

A Figura 5.3 apresenta os perfis de sedimentação das diferentes leveduras floculantes. Cada ponto foi plotado considerando a porcentagem de células em suspensão para cada tempo em relação ao controle no mesmo tempo.

Figura 5.3 - Perfis de sedimentação das quatro cepas de leveduras floculantes.



Pela análise do gráfico verifica-se que as cepas C14 e C2/00 apresentaram excelente sedimentação, enquanto as cepas C2 1/00 e C4 1/00 permaneceram por mais tempo em suspensão. Após 2 minutos a quantidade de células C14 em suspensão permaneceu constante, ao contrário, a C2/00 continua sedimentando de forma que ao final de 10 minutos a C2/00 apresentou menor quantidade de células em suspensão e o meio mais translúcido se comparado aos outros estudos de capacidade de floculação deste trabalho. Dessa forma, a cepa C2/00 apresentou melhor capacidade floculante e portanto melhor sedimentação.

Cruz (2019) avaliou a capacidade de floculação da cepa FL-20 após uma fermentação em reator *air-lift* ao final da fase batelada e da fase contínua. O teste apontou que 25% e 80% das células permaneceram em suspensão ao final da fase batelada e da fase contínua, respectivamente. As células C2/00 utilizadas no presente estudo nas fermentações batelada alimentada com melaço (item 5.5) não desflocularam e mantiveram a mesma velocidade de sedimentação obtido na Figura 5.3.

Assim, a cepa *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 foi selecionada para a continuação do trabalho, pois apresentou bons resultados, em relação ao rendimento e produtividade, maior velocidade de sedimentação e formação de flocos definidos.

## 5.2 Tempo de geração

Para que a fermentação resulte em um produto economicamente viável, o microrganismo deve ser capaz de se multiplicar rapidamente e produzir a substância de interesse em um período relativamente curto. A produção de etanol, dependendo das condições do processo, pode estar associada à reprodução do microrganismo e ao consumo de substrato (HISS, 2001; MARTINEZ et al., 2014), sendo assim, é imprescindível a determinação do tempo de geração. O tempo de geração é o tempo necessário para que o número total de células duplique e estes tempos variam entre os microrganismos e depende do meio e das condições de incubação (MADIGAN et al., 2010).

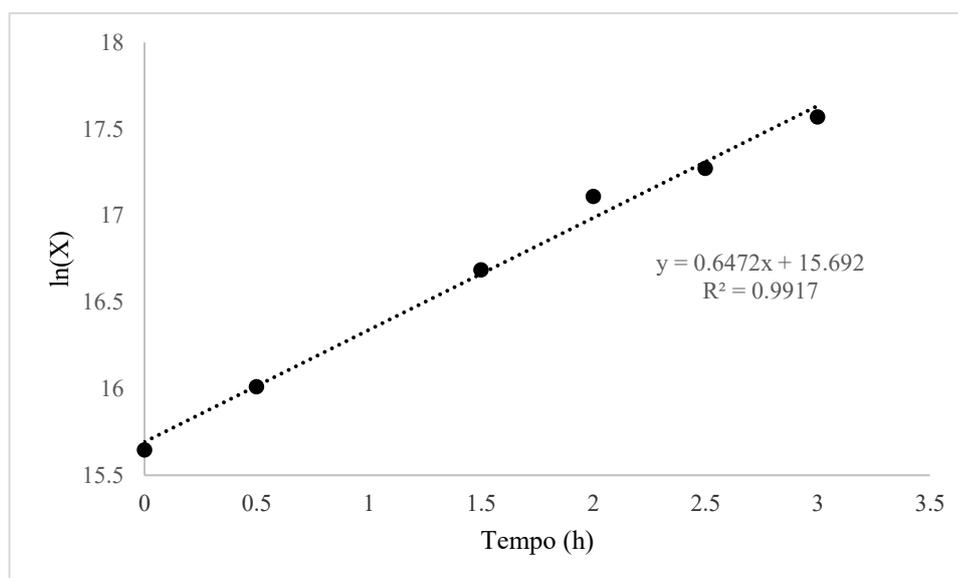
Para avaliar o tempo de geração realizou-se um processo fermentativo onde o número de células foi acompanhado ao longo do tempo. Com os valores obtidos na fase exponencial do crescimento, plotou-se o gráfico (Figura 5.4) e obteve-se o modelo da equação por regressão linear. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) é dada pelo coeficiente angular da Equação 5.1, sendo, portanto, igual a  $0,6472 \text{ h}^{-1}$ .

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (5.1)$$

Substituindo  $\mu$  na Equação (4.8) tem-se o valor do tempo de geração (Equação 5.2).

$$t_g = \frac{\ln 2}{0,6472} = 1,071 \text{ h} \quad (5.2)$$

**Figura 5.4** - Regressão linear para determinação da velocidade específica de crescimento.



Aplevicz (2013) avaliou duas cepas de *S. cerevisiae*, SC1 e SC2, isoladas do fermento natural de uva, quanto ao tempo de geração e a velocidade específica de crescimento utilizando como substrato o suco da uva Niágara rosada, obtendo para a cepa SC1 velocidade específica e tempo de duplicação iguais a  $0,573 \text{ h}^{-1}$  e 1,20 h, respectivamente. Enquanto para a cepa SC2 encontrou-se velocidade específica igual a  $0,331 \text{ h}^{-1}$  e tempo de geração igual a 2,09 h. Nogueira (2018) determinou o tempo de duplicação da *S. cerevisiae* PE-2, isolada da usina da Pedra, cultivada em maltose, peptona e extrato de levedura e obteve valor igual a 2,03 h com velocidade específica máxima igual a  $0,341 \text{ h}^{-1}$ . Patrascu et al., (2010) determinou o tempo de geração da *S. cerevisiae* Ethanol Red<sup>TM</sup> em meio à base de melação diluído obtendo valor igual a 1,33 h. Dessa forma o valor encontrado neste trabalho foi satisfatório para a espécie em questão.

### 5.3 Caracterização do Melaço

Os testes foram realizados utilizando o melaço gentilmente doado pela empresa Usina Uberaba. O melaço de cana-de açúcar apresentou  $84^\circ$  Brix e, de acordo com a relação estimada entre Brix e concentração de ART, cada  $^\circ$ Brix equivale a 6,88 g/L de ART. Além disso, o melaço apresentou 589,73 g/L de sacarose, 47,12 g/L de glicose e 77,33 g/L de frutose. A caracterização do melaço quanto à concentração de minerais e nitrogênio está apresentada na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2** – Concentrações de minerais analisados nos melaços de cana-de-açúcar.

<b>Minerais</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
Cobalto	0
Manganês	27,34
Cálcio	4.305,90
Magnésio	5.178,80
Sódio	827,40
Ferro	546,85
Zinco	3,44
Potássio	44.940,00
Nitrogênio	6.049,00

O melaço de cana-de-açúcar apresenta 400 a 800 mg/L de cálcio, 500 a 9.800 mg/L de magnésio, 4 a 48 mg/L de zinco e 15.000 a 50.000 mg/L de potássio (YAMAKAWA, 2016). Comparando estes valores com os obtidos na Tabela 5.2, verifica-se que a concentração de cálcio encontrada foi bem maior, a de zinco foi levemente inferior e as demais encontraram-se dentro da faixa encontrada na literatura. Cruz (2019) também caracterizou uma amostra de melaço obtendo valores inferiores ao da Tabela 5.2 para cálcio, ferro, magnésio, manganês, nitrogênio e potássio e valor próximo para o zinco.

A amostra de melaço analisada não apresentou quantidades significativas de hidroximetilfurfural e furfural. Os ácidos orgânicos detectados na amostra estão apresentados na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3** – Concentrações dos ácidos orgânicos na amostra de melaço.

<b>Ácido orgânico</b>	<b>Concentrações (g/L)</b>
Ácido oxálico	6,89
Ácido cítrico	138,21
Ácido aconítico	23,335
Ácido láctico	28,29
Ácido acético	10,12
Ácido isovalérico	2,405

O ácido aconítico é o principal ácido orgânico produzido pela cana-de-açúcar, os ácidos oxálico e cítrico também são encontrados na cana-de-açúcar. Como o melaço é um subproduto da indústria açucareira é comum encontrar estes ácidos em sua composição. A concentração média de ácido aconítico no melaço é de 3 a 7% (base seca). Os ácidos láctico e acético também

podem ser encontrados em alguns produtos do processo industrial, entretanto estes ácidos são resultantes das reações de degradação e/ou atividade microbiana (FERMENTEC, 2012).

Os ácidos orgânicos fracos, ácido acético e ácido láctico, são potencialmente tóxicos para *Saccharomyces cerevisiae*. O efeito inibitório destes ácidos depende do pH do meio, da constante de dissociação do ácido e de sua concentração molar. Os ácidos fracos não dissociados, são lipossolúveis e capazes de difundir passivamente para dentro da célula. Assim que a molécula entra no citoplasma dissocia-se devido ao pH intracelular, acidificando o citoplasma e desestabilizando o equilíbrio celular (VENTURA, 2007; COLOMBI et al., 2017). O ácido acético também pode ser metabolizado pela levedura para a produção de biomassa ou etanol (PERNA, 2016). Em estudo realizado por Fernandes et al. (2019) a adição de ácido acético 4 g/L na fermentação alcoólica de caldo de cana de açúcar por *S. cerevisiae* resultou na queda do seu rendimento em, aproximadamente, 70%. Colombi et al. (2017) avaliaram a variação de pH e crescimento celular de *S. cerevisiae* com a adição de ácido acético 3,5 e 6,5 g/L em meio sintético com 40 g/L de glicose. O ácido acético reduziu o pH do meio de 4,9 para 3,4, o consumo de glicose pela levedura foi drasticamente afetado e o crescimento celular inibido, por ambas concentrações de ácido acético.

Por outro lado o efeito dos ácidos orgânicos durante a fermentação atua sinergicamente quando outros agentes de estresse estão presentes, como alto teor alcoólico, alta temperatura e baixo pH, afetando a levedura mais intensamente (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001). Thomas, Hynes e Ingledew (2002) estudaram a influência do ácido acético (167 mM) e ácido láctico (548 mM) no crescimento de *S. cerevisiae* em meio mínimo. A adição dos ácidos acético e láctico reduziu o pH do meio para 2,76 e 2,12, respectivamente, e inibiu completamente o crescimento da levedura. Quando o pH do meio foi ajustado para 4,5 após a adição dos ácidos, a levedura cresceu, evidenciando a forte influência do pH no processo de inibição.

A amostra de melão analisada apresentou concentrações de ácido acético e ácido láctico (Tabela 5.3) suficientes para ocasionar certa inibição no processo de fermentação, entretanto o melão foi diluído para preparação do mosto e o pH foi ajustado no início das fermentações para minimizar o efeito inibitório.

## 5.4 Fermentação em batelada com meio à base de melação com ou sem adição de nutrientes

A Tabela 5.4 apresenta a média das eficiências, calculados pela Equação (4.20), em relação ao etanol produzido pelo total de açúcar redutor consumido, obtidos em cada condição de fermentação realizadas em *shaker*. Os experimentos foram realizados conforme item 4.2.2.3.

**Tabela 5.4** – Eficiência média da fermentação alcoólica para cada condição testada.

<b>Concentração da solução de melação (% v/v)</b>	<b>Adição de nutrientes (%)</b>	<b>Ausência de adição de nutrientes (%)</b>
13,6 (95,40 g/L ART)	37,42 ± 3,25 (A)(a)	28,41 ± 6,90 (A)(a)
16,4 (134,55 g/L ART)	79,36 ± 4,86 (B)(a)	63,48 ± 4,31 (B)(b)
20,5 (164,77 g/L ART)	61,19 ± 2,39 (C)(a)	75,87 ± 2,82 (C)(b)
24,6 (191,87 g/L ART)	61,81 ± 1,17 (C)(a)	75,21 ± 3,03 (C)(b)
30,0 (244,45 g/L ART)	72,35 ± 4,81 (B)(a)	85,40 ± 3,38 (C)(b)

A letra maiúscula se refere à comparação na coluna e a letra minúscula se refere à comparação na linha pelo teste de Tukey, com  $\alpha=5\%$ .

Analisando os valores da Tabela 5.4 verifica-se que a adição de nutrientes conduz à maiores eficiências nas fermentações com baixa concentração de melação, utilizando 13,6 e 16,4% de melação no meio, entre estes ensaios apenas para a concentração de 16,4% de melação a diferença entre as eficiências dos meios adicionados ou não de nutrientes foi significativa. Quando a concentração de melação aumentou para 20,5; 24,6 e 30% a adição de nutrientes resultou em uma queda significativa na eficiência da conversão de açúcares do processo fermentativo, observada na Tabela 5.4. Para fermentações de meios à base de melação com concentrações acima de 20,5% melhores resultados de eficiências foram obtidos sem a adição de nutrientes. Para concentrações mais altas de melação, os teores de sais já existentes no mesmo são suficientes ou até mesmo já estão acima dos valores ideais para a fermentação alcoólica. Assim a suplementação dos mostos formulados com valores acima de 20,5% do melação empregado neste trabalho com sais à base de potássio, magnésio e nitrogênio resulta em uma inibição do processo fermentativo. Segundo Lima, Basso e Amorim (2001) o melação de cana-de-açúcar é rico em nutrientes e o processo fermentativo pode ser inibido por alguns minerais como potássio e cálcio quando estão em quantidades excessivas no meio de fermentação.

Na ausência de adição de nutrientes a fermentação utilizando 20,5, 24,6 e 30% apresentaram eficiências iguais estatisticamente pelo teste de Tukey. Estes resultados são

promissores para o estudo de fermentação utilizando melação demonstrando ser possível a obtenção de rendimentos similares utilizando meios NG, HG e VHG.

Observando as eficiências, adicionado ou não de nutrientes no mosto, verifica-se que o menor valor de rendimento obtido foi para soluções de melação de 13,6%, como se trata de uma concentração baixa de ART 95,4 g/L, este açúcar foi utilizado para o crescimento celular em detrimento à fermentação. Nesta fermentação observou-se pelas concentrações celulares que a concentração inicial de  $5,10E+08$  aumentou após 18 h para  $7,35E+08$  células/mL.

Analisando a variação de crescimento celular na Tabela 5.5 verifica-se maior crescimento para as concentrações onde houve adição de nutrientes, indicando que a adição de nutrientes em excesso contribui para o crescimento celular em detrimento da produção de etanol. Phukoetphim et al. (2017b) também obtiveram aumento do crescimento celular com adição de extrato de levedura no meio de fermentação à base de sorgo com 160 e 240 g/L de açúcares. Na adição de nutrientes ainda o crescimento celular cai com o aumento da concentração da solução de melação (Tabela 5.5), o que pode ser influenciado pelo aumento da concentração de substrato.

Os valores negativos apresentados na Tabela 5.5 indicam morte celular. De acordo com a concentração de etanol a levedura sofre inibição afetando o crescimento celular. A fermentação da solução de melação 30% na ausência de nutrientes alcançou uma concentração final de etanol de 106 g/L, valor próximo ao P'max (item 5.6), sendo, portanto uma condição muito estressante para a levedura.

**Tabela 5.5** – Variação de crescimento celular médio para cada condição testada.

<b>Concentração da solução de melação (% v/v)</b>	<b>Adição de nutrientes (cél/mL)</b>	<b>Ausência de adição de nutrientes (cél/mL)</b>
13,6 (95,40 g/L ART)	2,40E+08	2,15E+08
16,4 (134,55 g/L ART)	3,83E+08	1,35E+08
20,5 (164,77 g/L ART)	1,37E+08	-1,13E+08
24,6 (191,87 g/L ART)	1,24E+08	-1,20E+08
30,0 (244,45 g/L ART)	5,33E+07	-2,40E+08

O melação supre a necessidade nutricional para multiplicação celular em alguns sais minerais e vitaminas, sendo necessário apenas suplementar o meio com nitrogênio e fósforo. Para fermentação alcoólica a suplementação é dispensada, uma vez que a quantidade disponível de nitrogênio e fósforo é suficiente para atender as necessidades para a manutenção celular durante a produção de etanol (YAMAKAWA, 2016).

Na Tabela 5.6 verifica-se que a adição de nutrientes conduz a maiores valores para viabilidade celular após 18 horas para todas concentrações de melação no meio. Entretanto a concentração da solução de melação e a adição de nutrientes não influenciaram estatisticamente na viabilidade celular. Analisando os resultados verifica-se que o aumento da concentração de melação no meio permitiu altos valores para a viabilidade celular, não sendo, portanto, o meio à base de melação prejudicial à levedura em condições que variaram de NG até HG.

**Tabela 5.6** - Viabilidade celular no tempo 0 e 18 horas para cada condição experimental.

<b>Concentração da solução de melação (% v/v)</b>	<b>Adição de nutrientes</b>	<b>0 horas Viab. cel.(%)</b>	<b>18 horas Viab. cel.(%)</b>
13,6 (95,40 g/L ART)	não	93 ± 7	90 ± 9
13,6 (95,40 g/L ART)	sim	87 ± 4	95 ± 3
16,4 (134,55 g/L ART)	não	98 ± 2	92 ± 6
16,4 (134,55 g/L ART)	sim	79 ± 16	95 ± 2
20,5 (164,77 g/L ART)	não	93 ± 5	90 ± 2
20,5 (164,77 g/L ART)	sim	91 ± 4	94 ± 3
24,6 (191,87 g/L ART)	não	98 ± 2	90 ± 2
24,6 (191,87 g/L ART)	sim	88 ± 12	95 ± 4
30,0 (244,45 g/L ART)	não	98 ± 2	88 ± 2
30,0 (244,45 g/L ART)	sim	98 ± 3	97 ± 2

Pradeep e Reddy (2010) também estudaram a suplementação de melação em várias concentrações (205-265 g/L de ART), obtendo maiores rendimentos utilizando melação na concentração de 240 g/L de ART suplementado com farinha de soja, sulfato de magnésio, ureia, farelo de trigo e farinha de milho em diferentes níveis. A utilização conjunta de ureia, farinha de soja e sulfato de magnésio permitiu o aumento do rendimento em 31% em relação ao controle. Além disso, Pradeep e Reddy (2010) verificaram que a suplementação de meios à base de melação acima de 252 g/L de ART não influenciou na eficiência da fermentação, o que corrobora com o presente estudo que observou que a presença de nutrientes não influenciou positivamente na eficiência da fermentação em concentrações de melação maiores que 20,5% (v/v) – 164,77 g/L de ART.

Barbosa et al. (2016) avaliaram a suplementação com peptona de um meio composto pela mistura de caldo e melação de cana-de-açúcar contendo 220 e 300 g/L de sacarose. Na concentração de 220 g/L de sacarose a suplementação não induziu efeitos positivos sob a produção de etanol, de forma análoga a este estudo. E para a concentração de 300 g/L a adição

de peptona melhorou a viabilidade celular e o desempenho fermentativo durante os ciclos realizados.

Deesuth et al., (2015) estudaram a suplementação de meio à base de caldo de sorgo com 200 g/L de sacarose com extrato de levedura e levedura seca. A utilização dos nutrientes à base de nitrogênio não provocaram uma melhora significativa no rendimento nem na concentração final de etanol, entretanto reduziu o tempo da fermentação, aumentando assim a produtividade. No presente estudo, como o tempo de fermentação foi fixo para todos os experimentos, não é possível verificar se a adição de nutrientes contribuiu com a produtividade.

## **5.5 Fermentações em batelada alimentada utilizando melaço de cana-de-açúcar com leveduras flocculantes**

Visto que nos ensaios anteriores o aumento da concentração de melaço apresentou resultados satisfatórios em relação à eficiência na produção de etanol e em relação à viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* de características flocculantes, estudos cinéticos de fermentações em batelada alimentada foram realizados. Além disso, a suplementação do meio à base de melaço com nutrientes não conduziu a um aumento de rendimento para concentrações acima de 20,5% (v/v). Assim, novos experimentos foram realizados para avaliar o comportamento fermentativo utilizando melaço sem adição de outros nutrientes, com ampliação de escala, utilizando reatores no sistema batelada alimentada, juntamente com variação nas condições de aeração e concentração de açúcares redutores no meio de alimentação.

### **5.5.1 Estudo da aeração**

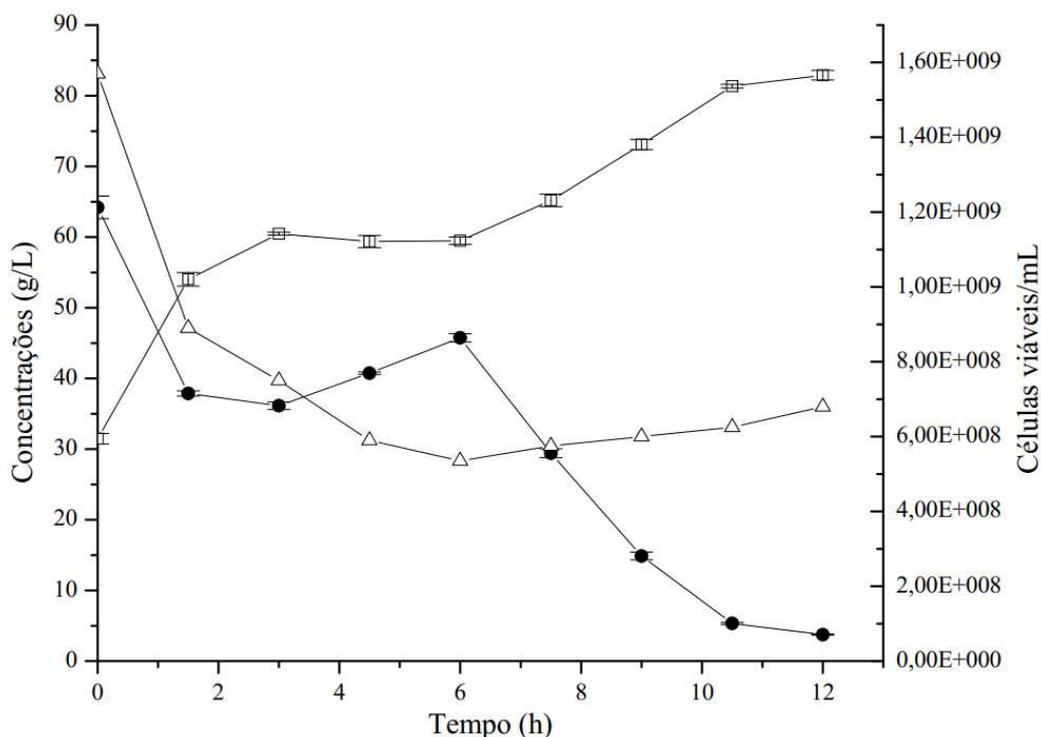
De acordo com trabalhos realizados anteriormente (LIU et al., 2016; DEESUTH et al., 2015; DEESUTH; LAOPAIBOON; LAOPAIBOON, 2016; ARSHAD et al., 2017) existem benefícios com a utilização de aeração do sistema, assim realizou-se o estudo da influência da aeração em duas fermentações em batelada alimentada com leveduras flocculantes em meio à base de melaço, em condições similares, sendo na presença e na ausência de aeração de 0,2 vvm.

A fermentação sem aeração foi realizada com:

- Concentração de etanol no inóculo de 31,47 g/L;
- Concentração de açúcares redutores no inóculo de 64,20 g/L;
- Concentração de açúcares redutores na alimentação de 195,05 g/L;
- Tempo de enchimento de 6,0 h;
- Vazão de recirculação de 39,12 L/h;
- Concentração de açúcares redutores considerando uma batelada de 162,17 g/L.

A Figura 5.5 apresenta as concentrações de etanol e açúcares redutores totais ao longo das fermentações em batelada alimentada sem aeração. A fermentação terminou com uma concentração de etanol de 82,91 g/L e de 3,74 g/L de ART. Entretanto pelo gráfico nota-se, que com 10,5 horas de fermentação, a maior parte dos açúcares já havia sido consumido com pouca variação após este período. Então o tempo de fermentação foi suficiente para o consumo de ART pela levedura.

**Figura 5.5** - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante fermentação não aerada.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (△) - concentração celular (cél/mL); (□) - concentração de etanol (g/L).

O comportamento das curvas no gráfico é típico de sistemas em batelada alimentada, já que até o tempo de 6 horas ocorre a alimentação de meio ao sistema. O açúcar vai sendo

alimentado, então a curva de ART resulta do efeito simultâneo da alimentação no reator com consequente efeito de diluição e seu consumo pela levedura. O etanol é produzido no decorrer da fermentação aumentando sua concentração, entretanto até 6 horas sua concentração é influenciada pela diluição do mosto. Após este período a concentração de etanol aumenta progressivamente até a conclusão da fermentação, enquanto a concentração de ART cai gradualmente. Durante a fermentação o crescimento celular é baixo, então sua concentração cai até 6 horas devido ao aumento de volume no reator, após este período verifica-se um crescimento celular contínuo.

O rendimento desta fermentação sem o uso de aeração foi de 89,57% em relação ao açúcar adicionado e a produtividade alcançada foi de 6,18 g/L.h.

A Tabela 5.7 apresenta a contagem de células e viabilidade celular durante o processo fermentativo, retratando que as células permaneceram viáveis durante a fermentação do melaço.

**Tabela 5.7** - Contagem de células viáveis e não viáveis durante a fermentação sem aeração.

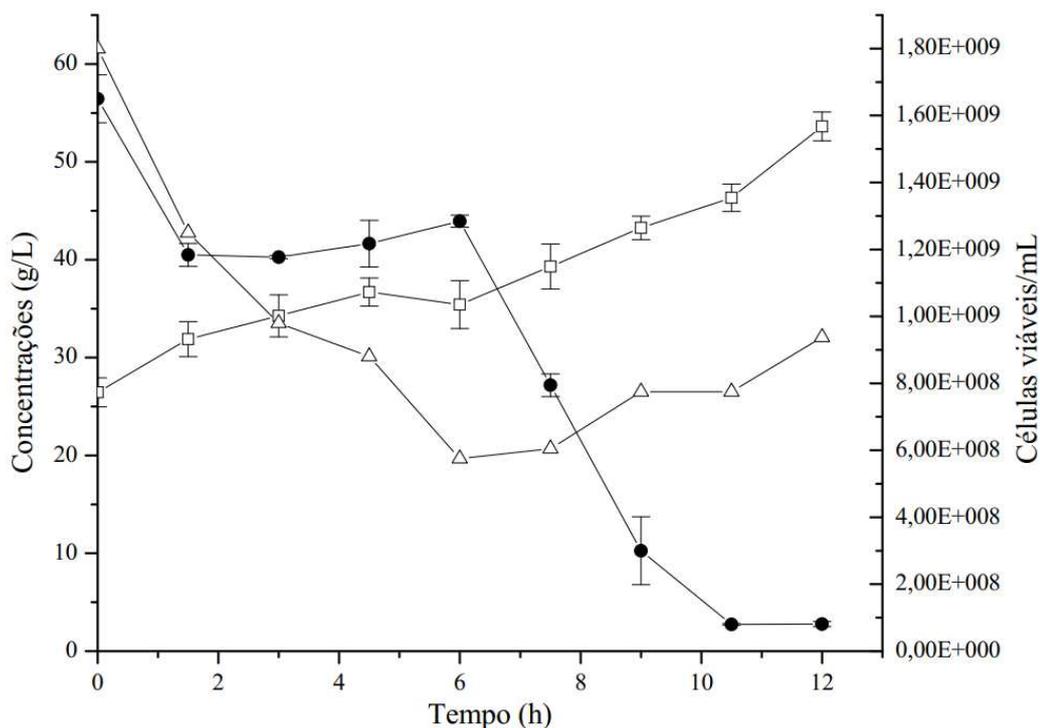
<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Viáveis (cel/mL)</b>	<b>Células não Viáveis (cel/mL)</b>	<b>Viabilidade Celular (%)</b>
0	1,57E+09	9,00E+07	95
1,5	8,90E+08	1,90E+08	82
3	1,06E+09	1,00E+07	99
4,5	5,90E+08	9,00E+07	87
6	5,35E+08	6,50E+07	89
7,5	3,50E+08	8,00E+07	81
9	8,65E+08	1,25E+08	87
10,5	3,75E+08	4,50E+07	89
12	6,80E+08	3,50E+07	95

Na fermentação com aeração de 0,2 vvm empregou-se:

- Concentração de etanol no inóculo de 26,45 g/L;
- Concentração de açúcares redutores no inóculo de 56,45 g/L;
- Concentração de açúcares redutores na alimentação de 202,19 g/L;
- Tempo de enchimento de 6,0 h;
- Vazão de recirculação de 39,12 L/h;
- Concentração de açúcares redutores considerando uma batelada de 165 g/L.

A Figura 5.6 apresenta as concentrações de etanol, de açúcares redutores totais e concentração celular ao longo da fermentação aerada com 0,2 vvm. A fermentação terminou após 12 horas com uma concentração de etanol de 53,63 g/L e de 2,77 g/L de ART.

**Figura 5.6** - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação aerada.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) – concentração celular (cél/mL); (□) – concentração de etanol (g/L).

O rendimento desta fermentação aerada em 0,2 vvm foi de 54,16% em relação ao açúcar adicionado e a produtividade foi de 3,80 g/L.h. Rendimento e produtividade foram menores se comparada com a fermentação sem aeração.

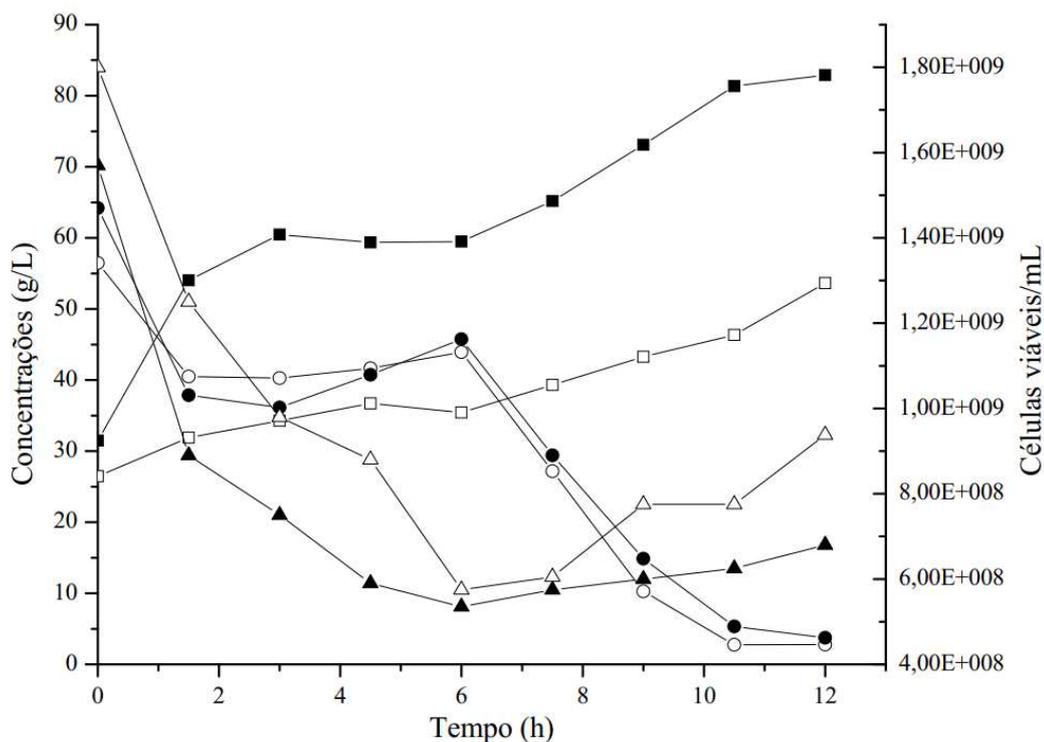
A Tabela 5.8 apresenta a contagem de células e viabilidade celular durante o processo fermentativo, retratando que as células permaneceram viáveis durante a fermentação do melaço com aeração.

**Tabela 5.8** - Contagem de células viáveis e não viáveis durante a fermentação aerada.

Tempo (h)	Células Viáveis (cel/mL)	Células não Viáveis (cel/mL)	Viabilidade Celular (%)
0	2,73E+09	1,00E+08	96
1,5	1,25E+09	1,65E+08	88
3	9,80E+08	1,05E+08	90
4,5	8,80E+08	1,45E+08	86
6	5,15E+08	0,00E+00	100
7,5	6,05E+08	5,50E+07	92
9	7,75E+08	4,00E+07	95
10,5	7,75E+08	9,50E+07	89
12	9,38E+08	6,00E+07	94

Comparando as duas fermentações (Figura 5.7) verifica-se o mesmo perfil de consumo de ART, sendo que na fermentação aerada o açúcar redutor no final da fermentação foi menor se comparado com a fermentação não aerada. Quanto à produção de etanol, pode-se perceber um decréscimo em sua concentração em todos os tempos na fermentação aerada. Ao final da fermentação a concentração de etanol obtida foi 35% menor em relação à concentração de etanol obtida na fermentação não aerada. A aeração favoreceu o crescimento celular, em detrimento da produção de etanol, o que pode ser constatado pelo comportamento da concentração celular na Figura 5.7 e por comparação dos valores de células viáveis nas Tabelas 5.7 e 5.8.

Figura 5.7 - Comparativo entre fermentação aerada e não aerada.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (▲) - concentração celular (cél/mL); (■) - concentração de etanol (g/L) para fermentação não aerada e (○) - concentração de ART (g/L); (△) - concentração celular (cél/mL); (□) - concentração de etanol (g/L) para a fermentação aerada.

Arshad et al. (2017) estudaram a aeração de 0,2; 0,4 e 0,6 vvm na fermentação do melaço a 32, 36 e 40°Brix. Em todos os níveis de aeração houve aumento da massa celular, sendo que quanto maior a aeração mais açúcar foi desviado para o crescimento celular. Entretanto em todos os níveis de aeração houve aumento da concentração final de etanol em relação ao controle, os melhores valores foram obtidos utilizando a taxa de aeração de 0,2 vvm.

Diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo, que apesar de utilizar a aeração de 0,2 vvm, utilizou-se concentrações de ART menor que do trabalho de Arshad et al., 2017.

Liu et al., (2016) também analisaram a microaeração na fermentação em batelada de glicose com cepas floculantes. Os autores avaliaram as taxas de aeração de 0,05 e 0,2 vvm na fermentação de meios com 260 e 300 g/L de glicose. Da mesma forma que o presente estudo, a utilização da aeração de 0,2 vvm no meio com 260 g/L de glicose resultou em maior formação de biomassa e menor concentração de etanol em relação ao controle. Liu e colaboradores obtiveram maior concentração de etanol final utilizando uma taxa de aeração de 0,05 vvm. Deesuth et al. (2015) também obtiveram melhores rendimentos e maior concentração final de etanol utilizando uma taxa de aeração 0,05 vvm nas primeiras 12 horas de fermentação em batelada de meio à base de caldo de sorgo com 280 g/L de sacarose. Estes dois estudos indicam que a taxa de aeração utilizada no presente trabalho foi alta, além de utilizar recirculação de células que é mais uma maneira de aerar o processo como um todo.

Por outro lado no estudo de Rivera e colaboradores (2017), em fermentações VHG, uma taxa de aeração 0,2 vvm ao final da fermentação foi imprescindível para obtenção de melhores produtividades e maior concentração de etanol, entretanto os autores afirmam que a taxa de aeração deve ser introduzida quando a concentração de etanol no reator é aproximadamente igual ao valor de  $P_{\text{máx}}$ . Em fermentação VHG, acima do valor de  $P_{\text{máx}}$ , a taxa de produção de etanol é consistente apenas com o produto não associado ao crescimento.

### 5.5.2 Estudo da concentração de ART em bateladas alimentadas em HG e VHG

Pela análise dos resultados acima percebe-se que tanto a suplementação, quanto a aeração foram ineficientes para melhorar o rendimento do processo fermentativo em batelada alimentada utilizando o melaço de cana-de-açúcar com leveduras floculantes em sistemas com recirculação de meio. Dessa forma novos experimentos foram realizados para analisar a influência da concentração de melaço na viabilidade celular e produção de etanol.

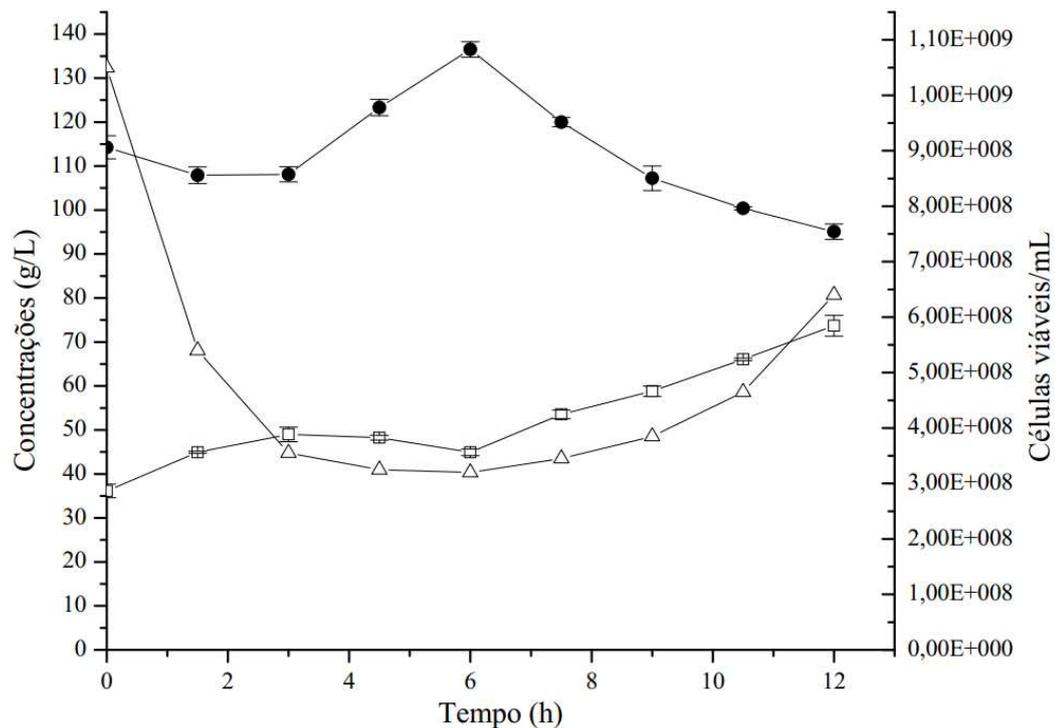
A **fermentação preliminar** foi realizada nas seguintes condições:

- Concentração de etanol no inóculo de 36,15 g/L;
- Concentração de açúcares redutores no inóculo de 114,26 g/L;
- Concentração de açúcares redutores na alimentação de 284,51 g/L;
- Tempo de enchimento de 6,0 h;
- Vazão de recirculação de 39,12 L/h;

- Concentração de açúcares redutores considerando uma batelada de 234,44 g/L.

A Figura 5.8 apresenta as concentrações de etanol e açúcares redutores totais ao longo da fermentação preliminar. Após 12 horas de fermentação obteve-se uma concentração de 73,69 g/L de etanol e de 95,07g/L de ART, essa quantidade de açúcar residual confirma a necessidade de um maior tempo de fermentação para a conclusão do processo.

**Figura 5.8** - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação preliminar.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (△) – concentração celular (cél/mL); (□) – concentração de etanol (g/L).

O rendimento desta fermentação foi de 52,82% em relação ao ART adicionado e, em relação ao ART consumido, a eficiência da fermentação alcança o valor de 88,86%. A produtividade foi de 5,27 g/L.h. Esta fermentação, preliminar, foi importante para observar a necessidade do aumento do tempo nas fermentações com altas concentrações de ART no mosto, assim o rendimento baixo de 52,82% é justificado pela insuficiência do tempo necessário para metabolização dos açúcares residuais pela levedura. Geralmente o tempo total de fermentação em processos HG e VHG variam de 48 a 75 horas (JOANNIS-CASSAN et al., 2014; ARSHAD et al., 2017; DEESUTH et al., 2015).

A Tabela 5.9 apresenta a contagem de células e a viabilidade celular durante o processo fermentativo, evidenciando que as células permaneceram viáveis durante a fermentação do melão na concentração HG (235 g/L de ART considerando o volume total do reator).

**Tabela 5.9** - Contagem de células viáveis e não viáveis e viabilidade celular durante a fermentação.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Células Viáveis (cel/mL)</b>	<b>Células não Viáveis (cel/mL)</b>	<b>Viabilidade Celular (%)</b>
0	1,05E+09	8,50E+07	92,51
1,5	5,40E+08	1,50E+07	97,30
3	3,55E+08	5,00E+06	98,61
4,5	3,25E+08	2,00E+07	94,20
6	3,95E+08	6,50E+07	85,87
7,5	6,40E+08	5,50E+07	92,09
9	2,00E+08	1,00E+07	95,24
10,5	2,65E+08	5,00E+06	98,15
12	3,45E+08	5,00E+06	98,57

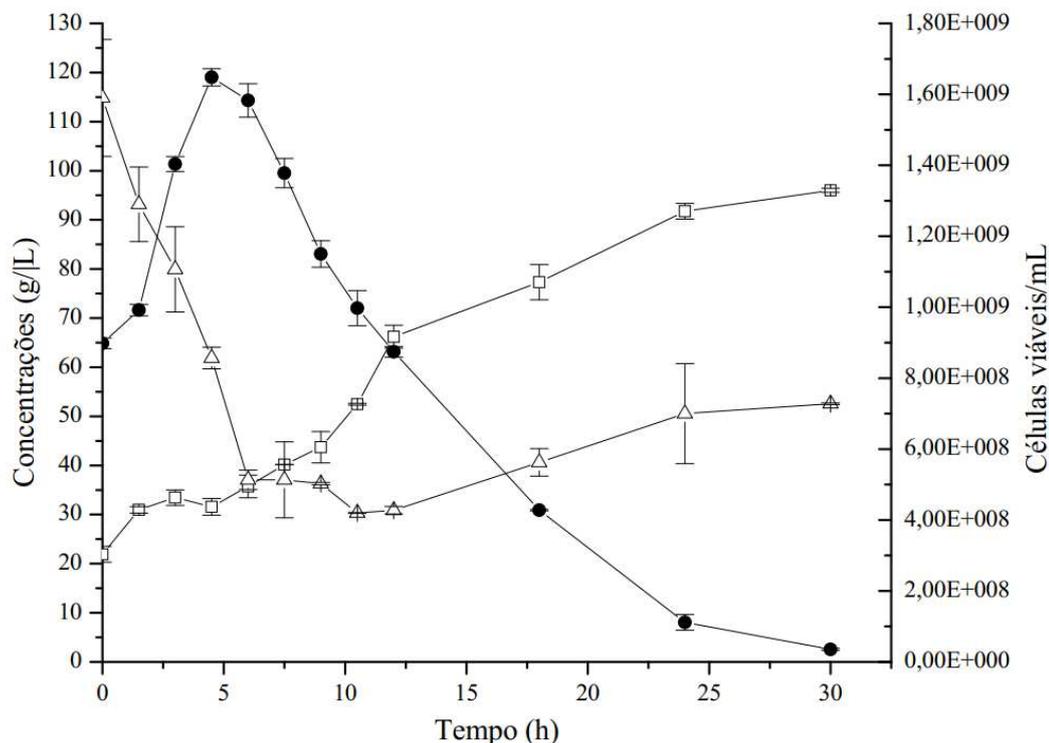
Além do tempo que foi insuficiente, a concentração de açúcares redutores no início do processo de 114 g/L foi alta de acordo com o trabalho de Andrietta; Andrietta e Stuppiello (2011) que apontam inibição pelo substrato em concentrações de 65 g/L de glicose e 70 g/L de frutose.

Assim realizou-se três fermentações com menor concentração de açúcares redutores no início do processo operando por mais tempo. As condições da **fermentação 1** foram:

- Concentração de etanol no inóculo de 21,09 g/L;
- Concentração de açúcares redutores no inóculo de 64,87 g/L;
- Concentração de açúcares redutores na alimentação de 270,95 g/L.
- Tempo de enchimento de 6,0 h;
- Vazão de recirculação de 39,12 L/h;
- Concentração de açúcares redutores considerando uma batelada de 209,13 g/L.

A Figura 5.9 apresenta os perfis de concentração de açúcares redutores, etanol e células ao longo do tempo para fermentação 1. Em 30 horas da fermentação 1 a concentração de açúcares redutores residuais foi baixa (2,55 g/L), a concentração de etanol alcançada foi igual a 96,02 g/L, resultando em um rendimento de 83,7% e produtividade de 2,98 g/L.h.

**Figura 5.9** - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 1.



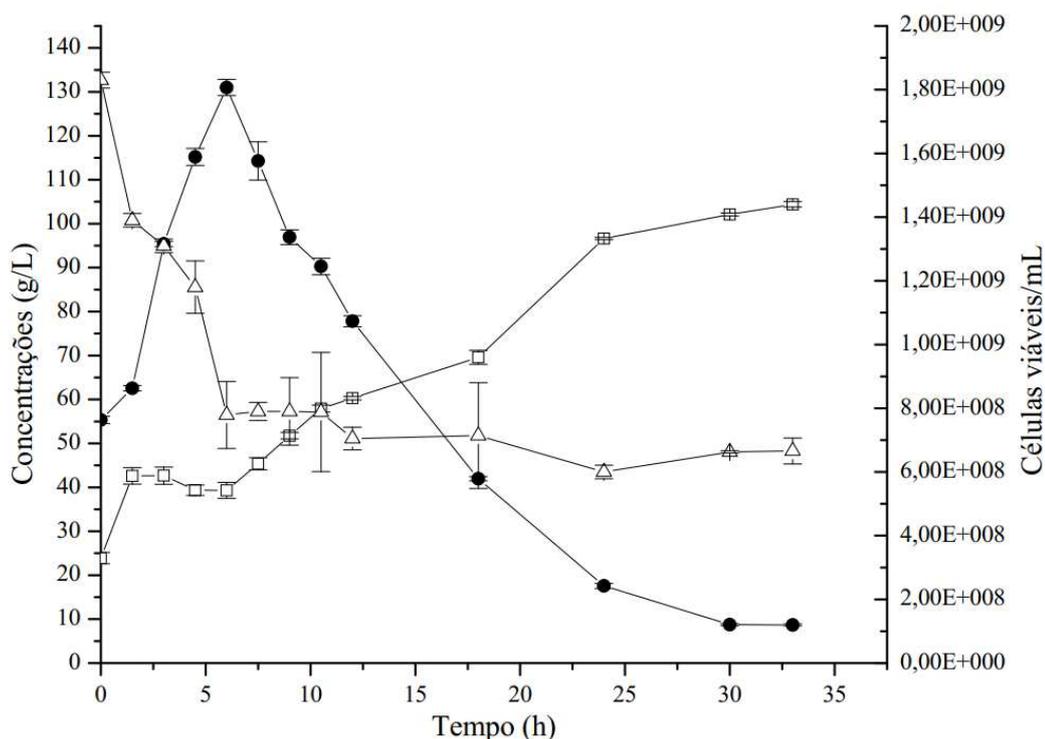
Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) - concentração celular (cél/mL); (□) - concentração de etanol (g/L).

As condições da **fermentação 2** foram:

- Concentração de etanol no inóculo de 23,88 g/L;
- Concentração de açúcares redutores no inóculo de 55,35 g/L;
- Concentração de açúcares redutores na alimentação de 290,07 g/L;
- Tempo de enchimento de 6,0 h;
- Vazão de recirculação de 39,12 L/h;
- Concentração de açúcares redutores considerando uma batelada de 222 g/L.

A Figura 5.10 apresenta a concentração de ART, etanol e de células ao longo da fermentação 2. Esta fermentação apresentou um tempo de duração maior que a anterior, uma vez que a concentração de ART na alimentação aumentou. Após 33 horas a fermentação alcançou uma concentração de 104,40 g/L de etanol, com um rendimento de 85,95% e produtividade de 2,95 g/L.h. A eficiência dessa fermentação considerando ART consumido foi de 89,45%, próximo a valores considerados ótimos no setor sucroenergético (SANTOS et al., 2015; YAMAKAWA, 2016). Nas últimas três horas de fermentação a concentração de ART manteve-se quase constante, finalizando com 8,68 g/L de ART residual.

**Figura 5.10** - Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 2.



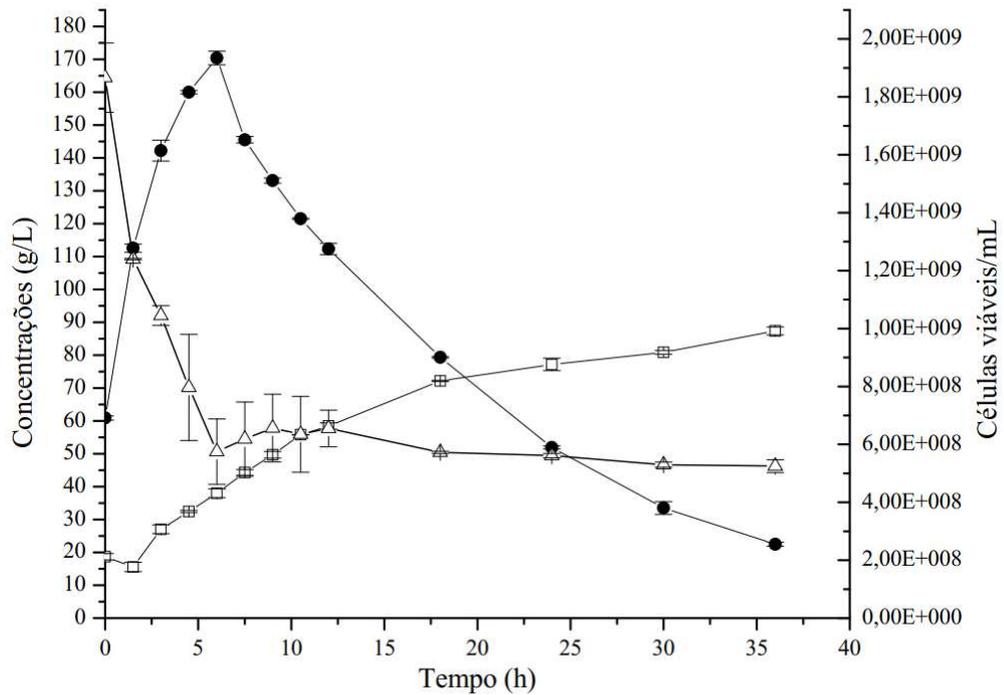
Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) – concentração celular (cél/mL); (□) – concentração de etanol (g/L).

As condições da **fermentação 3** foram:

- Concentração de etanol no inóculo de 18,70 g/L;
- Concentração de açúcares redutores no inóculo de 60,89 g/L;
- Concentração de açúcares redutores na alimentação de 331,54 g/L.
- Tempo de enchimento de 6,0 h;
- Vazão de recirculação de 39,12 L/h;
- Concentração de açúcares redutores considerando uma batelada de 250,34 g/L.

A Figura 5.11 apresenta as concentrações de ART, etanol e células ao longo da fermentação 3. Ao final de 36 horas de fermentação a concentração de etanol foi de 87,37 g/L, com um rendimento baixo de 63,91% e produtividade de 2,27 g/L.h. Mesmo com uma concentração de ART residual considerável de 22,46 g/L a eficiência da fermentação (70,21%) também foi baixa. A partir de 12 horas de fermentação verifica-se uma queda contínua na concentração celular, indicando morte de células.

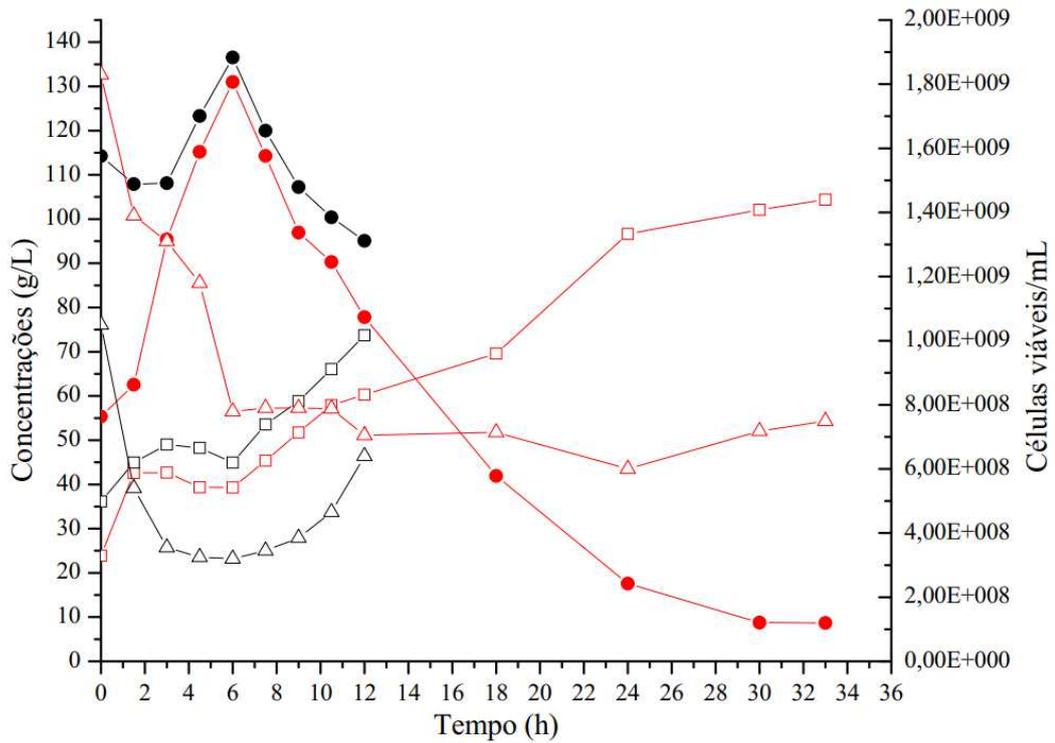
**Figura 5.11** – Concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 3.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) – concentração celular (cél/mL); (□) – concentração de etanol (g/L).

Comparando a fermentação preliminar e a fermentação 2 (Figura 5.12), as quais tiveram concentrações da solução de alimentação semelhantes, diferindo apenas na concentração inicial de ART e tempo de fermentação, verifica-se que ao final de 12 horas a fermentação preliminar alcançou maior concentração de etanol (73,69 g/L) do que a fermentação 2 (60,28 g/L). Com aumento do tempo de fermentação observou-se uma grande diferença na concentração de etanol formado, atingindo o valor de 104,4 g/L. Além disso, o consumo de ART, nestas condições, estabilizou após 30 horas de fermentação.

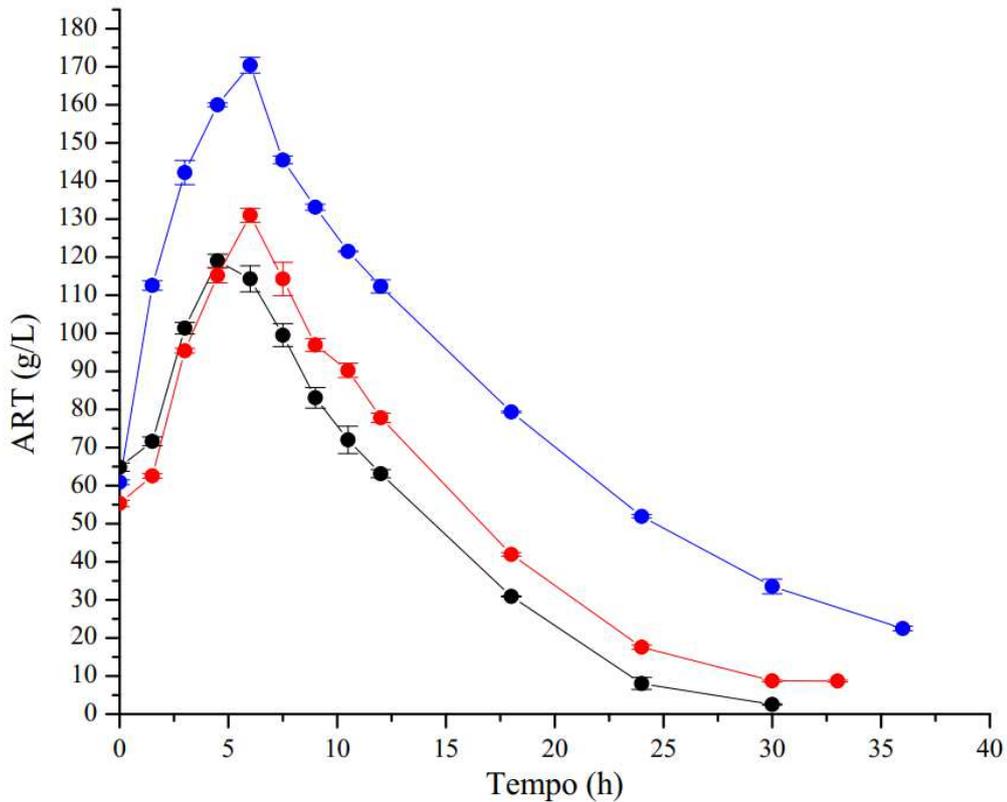
**Figura 5.12** – Comparação entre fermentação preliminar e fermentação 2.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) – concentração celular (cél/mL); (□) – concentração de etanol (g/L) em preto para fermentação preliminar e em vermelho para fermentação 2.

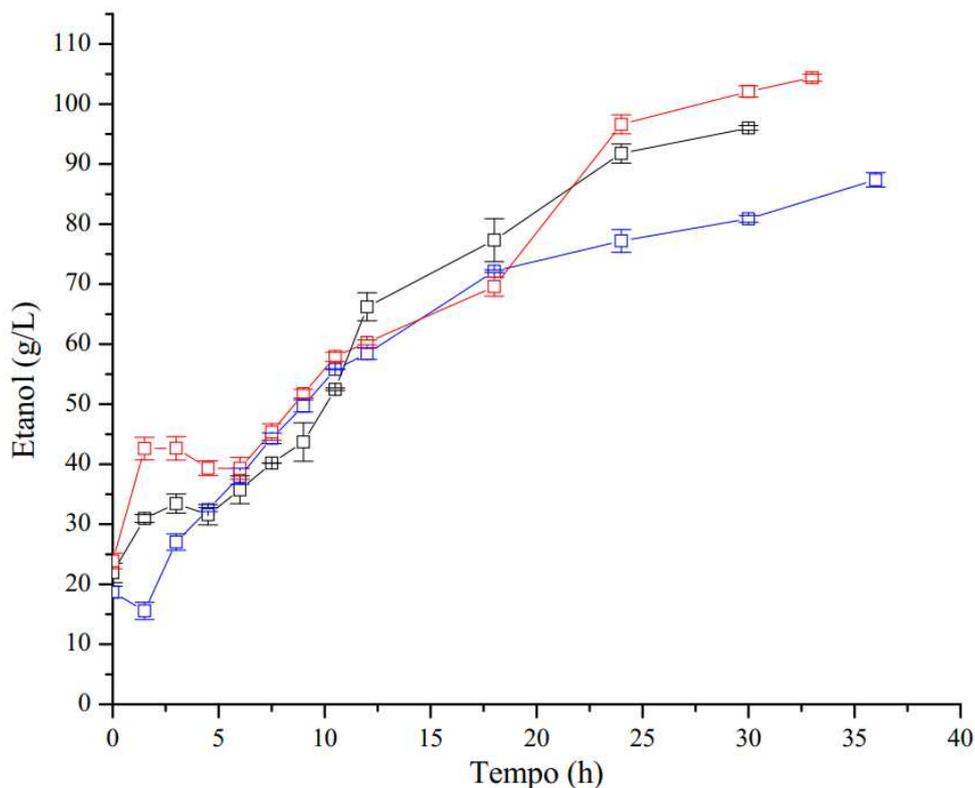
As Figuras 5.13, 5.14 e 5.15 apresentam perfis comparativos entre as concentrações de ART, etanol e concentração celular para as fermentações 1, 2 e 3. Na Figura 5.13 verifica-se o mesmo comportamento ao longo do tempo quanto à concentração de ART para as três fermentações, sendo que as fermentações que utilizaram maiores concentrações de ART no processo dependeram de mais tempo e os açúcares residuais foram maiores. A fermentação 2 e 3 apresentaram máxima concentração de ART no reator no tempo de 6 horas iguais a 131 e 170,4 g/L, enquanto a fermentação 1 apresentou máxima concentração de ART em 4,5 h de fermentação igual a 119,2 g/L. Na fermentação 1 quase todos os açúcares redutores foram consumidos em 30 horas enquanto a fermentação 3 apresentou maior concentração de açúcares residuais ao final de 36 horas.

**Figura 5.13** – Concentrações de ART para fermentações 1 (preto), 2 (vermelho) e 3 (azul).



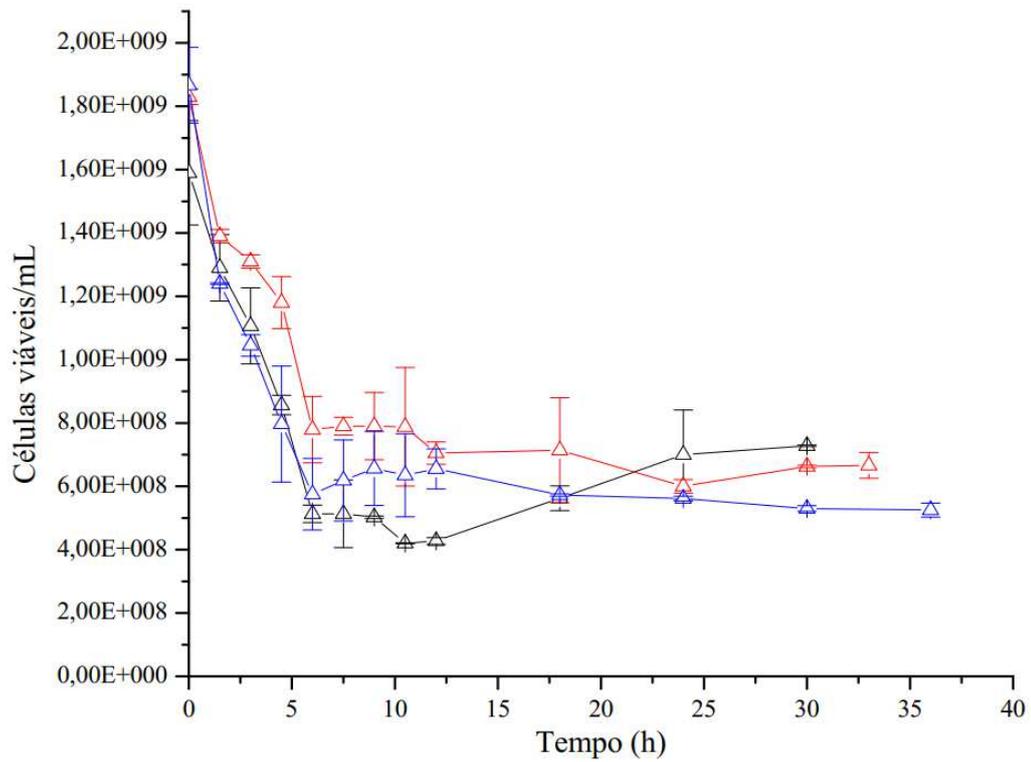
Na Figura 5.14 observa-se concentrações variáveis de etanol até 6 horas devido a influência conjunta da diluição do mosto devido à alimentação e produção de etanol pela levedura. Após 6 horas até 18 horas verifica-se que as três fermentações apresentaram concentrações de etanol próximas. Após 18 horas a taxa de produção de etanol na fermentação 3 apresenta uma queda, enquanto nas fermentações 1 e 2 esta queda ocorre após 24 horas. Na fermentação 1 a produção de etanol cessa devido à finalização dos açúcares, enquanto a fermentação 2 prossegue alcançando a maior concentração de etanol final, dentre as três fermentações. A concentração final de etanol (104,40 g/L) da fermentação 2 foi bem próxima do  $P'_{\text{máx}}$  (105,35 g/L) apresentada no item 5.6.

**Figura 5.14** – Concentrações de etanol para as fermentações 1 (preto), 2 (vermelho) e 3 (azul).



De acordo com a Figura 5.15 as concentrações celulares das três fermentações apresentaram comportamento similar até 12 horas. A partir de 12 horas ocorre aumento de concentração celular na fermentação 1 e queda progressiva na concentração de células viáveis na fermentação 3. Na Tabela 5.10 verifica-se que as menores viabilidades celulares foram obtidas para a fermentação 3, nos tempos de 18 e 24 horas de fermentação. Na fermentação 2, entre 18 e 24 horas houve queda da concentração de células viáveis, entretanto a produção de etanol continuou, fato também relatado por Joannis-Cassan e colaboradores (2014) na fermentação em batelada alimentada de 255 g/L de sacarose proveniente de xarope de beterraba, onde houve redução da concentração celular sem interferência na produção de etanol. A redução de células pode ser uma resposta das leveduras à inibição pelo etanol.

**Figura 5.15** – Concentração celular para as fermentações 1 (preto), 2 (vermelho) e 3 (azul).



**Tabela 5.10** - Viabilidade celular durante as fermentações 1, 2 e 3.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Fermentação 1</b>	<b>Fermentação 2</b>	<b>Fermentação 3</b>
0	84%	92%	93%
1,5	83%	92%	94%
3	84%	89%	87%
4,5	90%	97%	94%
6	86%	94%	85%
7,5	83%	91%	91%
9	82%	88%	84%
10,5	89%	91%	91%
12	83%	91%	90%
18	89%	87%	73%
24	82%	88%	76%
30	84%	89%	79%
33	-	84%	-
36	-	-	77%

Na fermentação 3 verifica-se um tempo bem maior de exposição à maiores concentrações de açúcares redutores (Figura 5.13) em relação à fermentação 1 e 2. Assim, as leveduras na fermentação 3, além do estresse devido ao aumento da concentração de etanol, podem ter apresentado um estresse adicional devido à concentração de ART. Ambas concentrações podem ter efeito sinérgico, afetando a levedura mais severamente, levando a um menor rendimento em etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008) e/ou ainda o estresse adicional da concentração de açúcar reduziu o tempo de latência na resposta das leveduras ao estresse. Joannis-Cassan et al. (2014) conseguiram aumentar a concentração final de etanol controlando a taxa de alimentação para manter uma concentração de sacarose inferior a 100 g/L no interior do reator e modificando a duração do tempo de alimentação. De acordo com Joannis-Cassan e colaboradores (2014) a fase de alimentação deve ser controlada de modo a evitar a exposição da levedura por muito tempo à altas concentrações de etanol (acima de 10% v/v) e açúcares simultaneamente, limitando a inibição sinérgica por alta concentração de açúcares e etanol. Dessa forma, pode-se concluir que o tempo de alimentação na fermentação 3 foi baixo, o que afetou negativamente a produção de etanol.

Sonego e colaboradores (2016) avaliaram o tempo de alimentação, 3 e 5 horas, na fermentação alcoólica em batelada alimentada convencional. A alimentação foi realizada com solução de sacarose 180 g/L. Ao final da alimentação da fermentação com tempo de enchimento de 3 h a concentração de substrato acumulado atingiu cerca de 120 g/L, enquanto na fermentação com tempo de enchimento de 5 h a concentração de substrato atingiu valor por volta de 75 g/L. Da mesma forma, os pesquisadores concluíram que um tempo de alimentação maior controlou a concentração de substrato no mosto, o que contribuiu para minimizar a inibição pelo substrato durante as primeiras horas da fermentação.

A Tabela 5.11 apresenta os parâmetros analisados nas três fermentações em batelada alimentada com meio à base de melaço de cana-de-açúcar. A concentração final de etanol representa a concentração de etanol atingida no interior do reator ao término de cada fermentação.

**Tabela 5.11** - Parâmetros analisados nas fermentações 1, 2 e 3.

<b>Fermentação</b>	<b>Concentração final de etanol (g/L)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Produtividade (g/(L.h))</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<b>1</b>	96,02	83,70	2,98	84,74
<b>2</b>	104,4	85,95	2,95	89,45
<b>3</b>	87,37	63,91	2,27	70,21

Arshad et al. (2017), na fermentação em batelada alimentada em escala industrial com recirculação de células utilizando melaço 32, 36 e 40° Brix, obtiveram concentrações finais de etanol, após 60 horas de fermentação, respectivamente, iguais a 70,22; 73,38 e 75,74 g/L com concentrações de ART residuais iguais a 35,41; 41,00 e 60,40 g/L, respectivamente. Os pesquisadores conseguiram aumentar a concentração de etanol final utilizando uma aeração de 0,2 vvm, obtendo 12,2% (v/v) de etanol na fermentação do meio com 40° Brix, e reduzir o teor de ART residuais para 18,7 g/L. Comparando estes resultados com a fermentação 2, onde a concentração total de ART utilizada de 222 g/L corresponde à 33° Brix, verifica-se que a concentração final de etanol obtida neste estudo de 104,4 g/L (13,2% v/v) foi maior que a obtida no trabalho de Arshad e colaboradores, além disso o teor de ART residual de 8,68 g/L foi inferior e o tempo de fermentação também foi consideravelmente menor.

Joannis-Cassan et al., 2014 realizaram uma fermentação em batelada alimentada utilizando xarope de beterraba. A alimentação do meio com concentração de sacarose de 580 g/L foi realizada por 16,6 horas, com um total de sacarose de 255 g/L se considerado batelada simples. Ao final de 53 horas de fermentação os pesquisadores obtiveram uma concentração final de etanol de 15,2% v/v, produtividade de 2,3 g/L.h e eficiência de 88%. Apesar da concentração de etanol alcançada na fermentação 2 de 13,2% v/v ser menor que a obtida por Joannis-Cassan e colaboradores, a sua produtividade de 2,95 g/L.h foi maior devido ao menor tempo gasto na fermentação (33 horas) e a eficiência também foi ligeiramente maior.

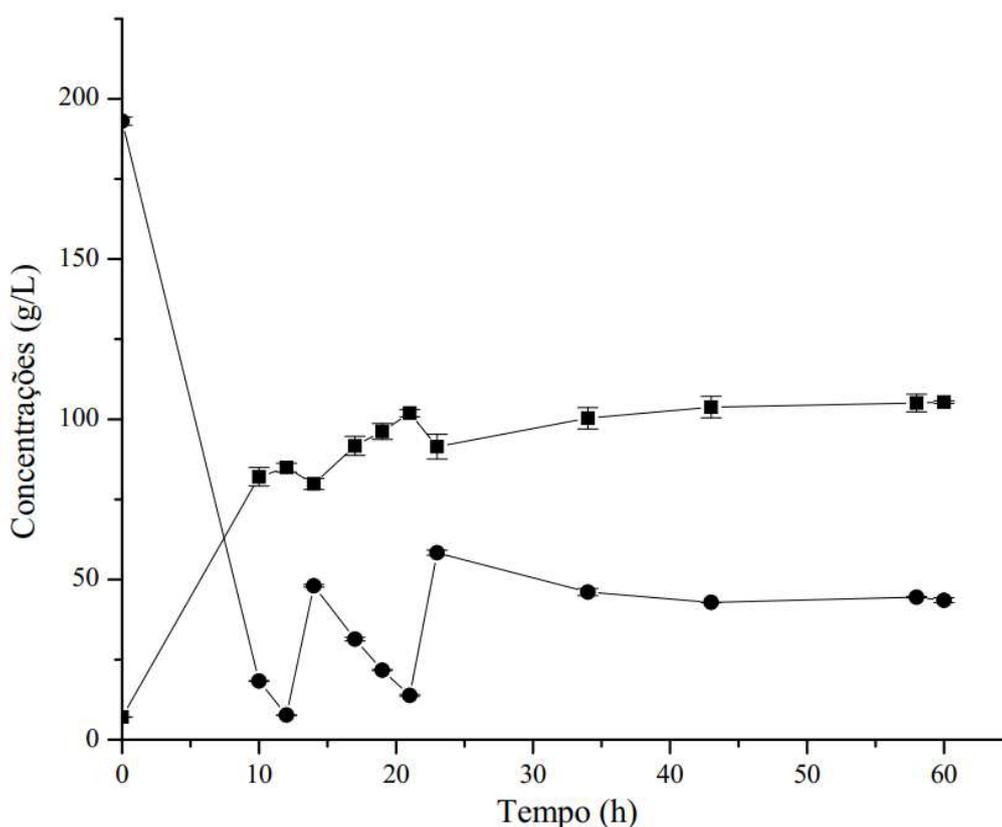
Rivera et al., (2017) realizaram a fermentação em batelada alimentada de meio composto pela mistura de caldo e melaço de cana-de-açúcar com 400 g/L de ART (se considerado batelada simples) alcançando uma concentração máxima de etanol de 120 g/L em apenas 11,5 horas de fermentação. Para alcançar uma produtividade alta de 10,2 g/L.h os pesquisadores utilizaram temperatura adequada e uma microaeração de 0,2 vvm quando a concentração de etanol foi aproximadamente igual ao  $P_{máx}$ . Entretanto parte dos açúcares foram destinados à formação de subprodutos como glicerol, ácido lático e ácido acético.

Os resultados obtidos com estes experimentos foram muito relevantes para a fermentação HG com melaço de cana-de-açúcar utilizando cepa floculante. A fermentação VHG não apresentou bons resultados, provavelmente devido à inibição pela concentração de substrato. Além disso, a melhor fermentação (fermentação 2) apresentou ART residual, evidenciando que para aumentar a concentração de etanol final outras estratégias devem ser adotadas para que a levedura consiga suportar maiores concentrações de etanol.

## 5.6 Produção máxima de etanol

Na Figura 5.16 está apresentado o estudo da produção máxima de etanol ( $P^{\text{máx}}$ ) com os perfis das concentrações de etanol e açúcares redutores totais durante a realização do experimento, utilizando, como substrato, a solução aquosa de melaço. Pela análise do gráfico (Figura 5.16) verifica-se que após 40 horas não houve mais consumo de substrato pela levedura devido inibição pelo produto. A produção máxima de etanol foi de 105,35 g/L, que corresponde à 13,35% v/v.

**Figura 5.16** - Perfis de concentração de ART e etanol em função do tempo para o  $P^{\text{máx}}$ .



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (■) – concentração de etanol (g/L).

Guidini et al. (2014) avaliaram o perfil da produção máxima de etanol, pela *Saccharomyces cerevisiae* C2/00, mesma cepa analisada, em meio sintético, obtendo produção máxima de etanol próxima a deste estudo (110 g/L) após 30 horas de fermentação. Observa-se que utilizando o melão como fonte de açúcar o comportamento da levedura não se alterou significativamente.

Como o melão é resultante da produção de açúcar ele apresenta alguns componentes que agem como inibidores no processo fermentativo, como o ácido acético e láctico, entre outros; adicionalmente a pressão osmótica interfere no processo (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011; CAO et al., 2014). Assim este experimento mostra que é possível obter concentrações finais de etanol a partir da fermentação do melão próximas às que são obtidas utilizando o meio sintético.

Cruz (2015) avaliou a produção máxima de etanol de uma cepa industrial Y904 na temperatura de 20, 25 e 32°C. À 20°C, após 72 horas de fermentação, obteve-se a concentração máxima de etanol de 15% v/v; à 25°C obteve-se uma concentração máxima de etanol de 17,36% v/v após 60 horas e à 32°C obteve-se uma concentração de etanol de 15,7% v/v após 32 horas. A cepa de *S. cerevisiae* utilizada por Cruz (2015) apresentou maior tolerância ao etanol do que a C2/00 à 32°C. Este estudo indica que a temperatura influencia na tolerância da cepa ao etanol e que é possível obter maiores concentrações de etanol em temperaturas mais baixas, fato também verificado por Rivera et al. (2017). Assim a redução da temperatura do processo poderia ser uma alternativa para aumentar o valor de  $P_{m\acute{a}x}$  da cepa flocculante.

Phukoetphim et al. (2017a) estudaram a tolerância ao etanol das cepas de *S. cerevisiae* NP01 e ATCC 4132. Para tal, inoculou as células em meio de suco de sorgo doce 100 g/L, juntamente com diferentes concentrações de etanol (0, 6, 9, 12, 15 e 18% (v/v)). À medida que as concentrações de etanol aumentaram o  $\mu$  diminuiu acentuadamente, de forma que a inibição estava completa em 9-12% de etanol após 24 horas. O estudo demonstra outra forma de determinar a tolerância da cepa ao etanol, entretanto o método não considera outros metabólitos que podem ser formados e provocam inibição durante o processo fermentativo.

## 5.7 Cinética da fermentação alcoólica

A partir dos resultados obtidos na fermentação 2, estimou-se os parâmetros cinéticos do modelo de Tosseto (2002), de acordo com a Equação 5.3. Os coeficientes de rendimento celular e de etanol foram calculados a partir dos resultados experimentais, o valor de  $P_{m\acute{a}x}$  utilizado no

ajuste foi obtido experimentalmente (item 5.6). Os demais parâmetros apresentados na Tabela 5.12 foram obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais.

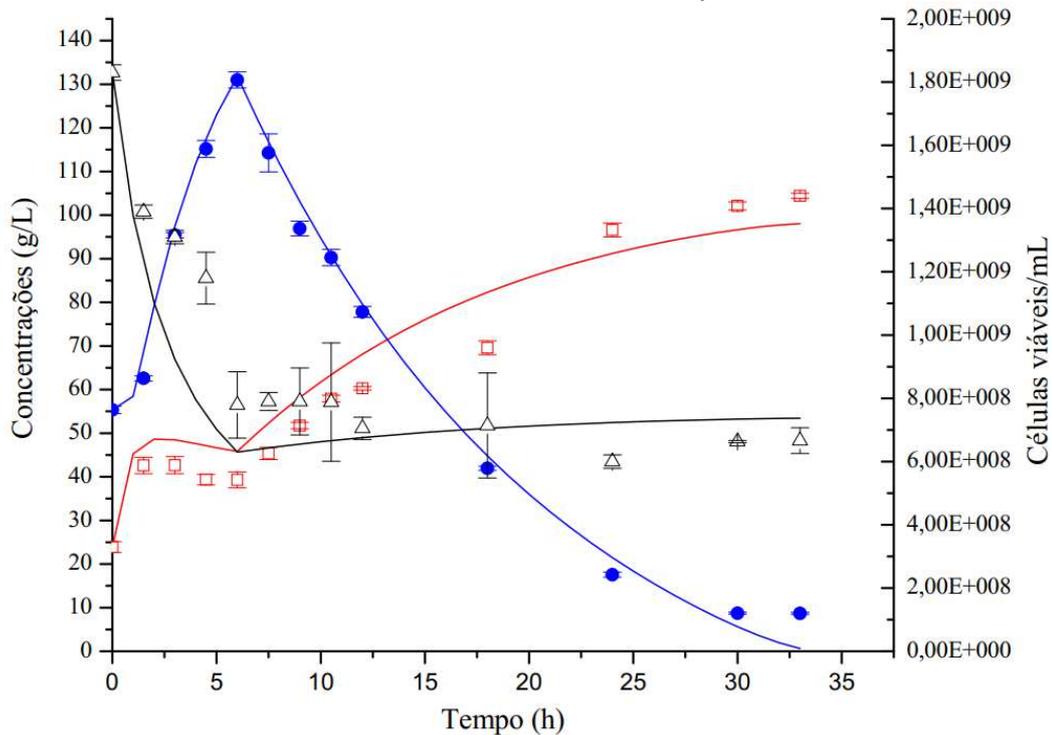
$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{\left(k_s + S + \frac{S^2}{K_{IS}}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n \quad (5.3)$$

**Tabela 5.12** – Parâmetros obtidos a partir dos dados experimentais e do ajuste do modelo.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
$Y_{x/s}$ (cél/g <sub>s</sub> )	9,46x10 <sup>5</sup>
$Y_{P/s}$ (g <sub>e</sub> /g <sub>s</sub> )	0,457
$P'_{m\acute{a}x}$ (g/L)	105,35
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	0,555
$n$	2,034
$K_s$ (g/L)	2,63
$K_{IS}$ (g/L)	12,437
$m_s$ (g/(cél.h))	9,4x10 <sup>-10</sup>
$m_p$ (g/(cél.h))	2x10 <sup>-11</sup>

A Figura 5.17 compara os dados simulados a partir do modelo e os dados experimentais da fermentação 2 (alimentação de 290 g/L de ART e tempo total de fermentação de 33 horas) para concentração de ART, etanol e células durante o processo. Analisando o gráfico verifica-se que o modelo proposto apresentou bom ajuste aos dados experimentais, ocorrendo maior variação nos valores de concentração celular, os quais apresentaram também os maiores desvios.

**Figura 5.17** – Comparação dos dados simulados e experimentais para concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 2.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) – concentração celular (cél/mL); (□) – concentração de etanol (g/L) experimentais. As linhas representam os dados simulados. Na cor preto para concentração celular, cor vermelha para concentração de etanol e cor azul para concentração de ART.

Os parâmetros ajustados apresentados na Tabela 5.12 também foram utilizados na simulação do comportamento da fermentação 1 (alimentação de 271 g/L de ART e tempo total de fermentação de 30 horas), obtendo o gráfico apresentado na Figura 5.18. Analisando o gráfico verifica-se que o modelo não apresentou bom ajuste aos dados para concentração de ART, para concentração de etanol e células o modelo proposto apresentou melhor ajuste.

Ferrari (2013) utilizou o modelo de Tosetto (2002) para determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica em batelada alimentada de mosto a base de caldo e melaço de cana-de-açúcar obtendo  $K_S$  e  $K_{IS}$  iguais a 5 e 40 g/L, respectivamente.

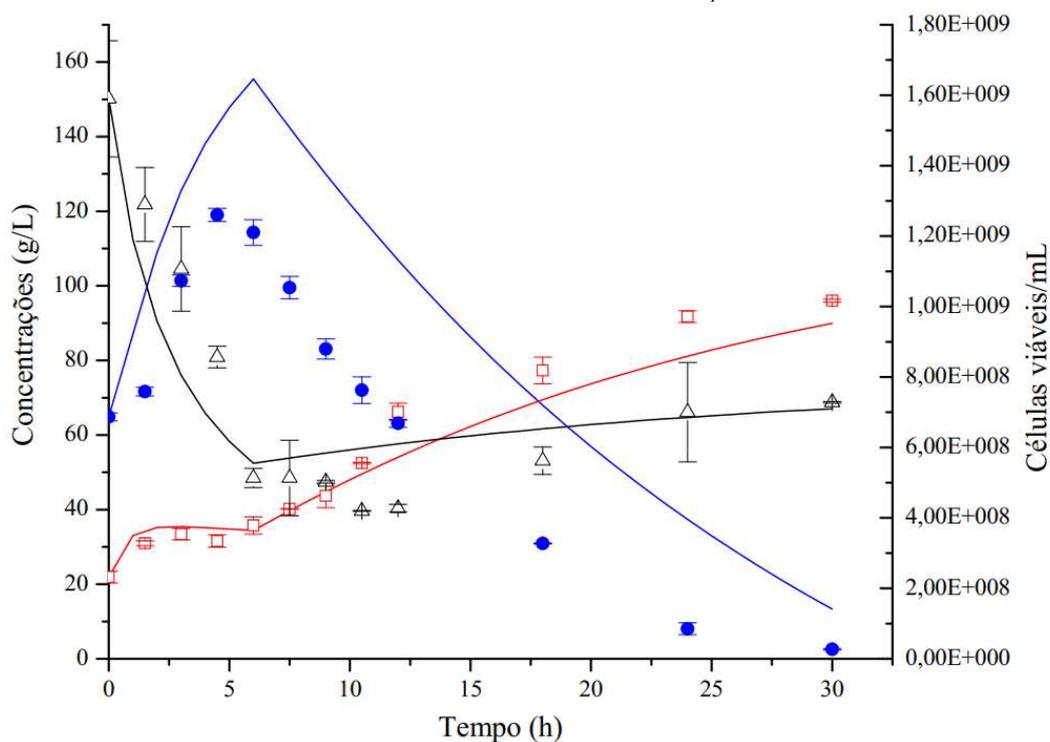
Guidini et al. (2014) utilizaram o modelo cinético de Tosetto (2002) para descrever a cinética de fermentação alcoólica de meio sintético por *S. cerevisiae* C2/00. A modelagem foi realizada para batelada alimentada com recirculação de células. A velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) encontrada foi de  $0,182\text{ h}^{-1}$ , e as constante de saturação ( $K_S$ ) e de inibição ( $K_{IS}$ ) foram 30,24 g/L e 109,86 g/L, respectivamente, obtendo um bom ajuste ao modelo.

Sonego e colaboradores (2016) também obtiveram excelentes ajustes utilizando o modelo de Tosetto (2002) para descrever o comportamento cinético na fermentação em batelada

alimentada de sacarose. Os parâmetros cinéticos determinados pelo modelo foram  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $K_S$  e  $K_{IS}$  iguais a  $0,125 \text{ h}^{-1}$ ,  $25,1 \text{ g/L}$  e  $131,8 \text{ g/L}$ , respectivamente.

A partir do modelo de Atala et al. (2001), Rivera et al. (2017) desenvolveram um modelo cinético dependente da temperatura para ser utilizado na simulação do processo fermentativo VHG em batelada alimentada. Dentre os parâmetros cinéticos alguns foram fixados para uma determinada temperatura, como  $K_S$  igual a  $4,1 \text{ g/L}$ , e os demais foram estimados. Os parâmetros cinéticos foram estimados para temperaturas que variaram de  $24$  a  $36^\circ\text{C}$ , obtendo valores de  $K_{IS}$  que variaram de  $0,0033$  a  $0,0048 \text{ g/L}$ .

**Figura 5.18** - Comparação dos dados simulados e experimentais para concentrações de açúcares redutores, etanol e de células durante a fermentação 1.



Onde: (●) - concentração de ART (g/L); (Δ) - concentração celular (cél/mL); (□) - concentração de etanol (g/L) experimentais. As linhas representam os dados simulados. Na cor preto para concentração celular, cor vermelha para concentração de etanol e cor azul para concentração de ART.

Por definição,  $K_S$  é o valor de concentração de substrato limitante na qual a taxa de crescimento é metade do valor máximo e  $K_{IS}$  é a concentração de substrato na qual se inicia a inibição (PINHEIRO et al., 2017). Os valores para as constantes de saturação e inibição pelo substrato reportadas na literatura apresentam alta variabilidade, evidenciando que estas constantes podem ser influenciadas pelo modelo selecionado e condições da fermentação.

## 6 CONCLUSÃO

- No estudo da capacidade fermentativa e de floculação a cepa mais apta para o processo de fermentação alcoólica foi a cepa *Saccharomyces cerevisiae* C2/00;
- O tempo de geração encontrado para *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 de 1,071 h próximos aos relatados na literatura;
- A adição de nutrientes na fermentação em batelada de meio à base de melaço de cana-de-açúcar não influenciou positivamente na eficiência da fermentação para processos utilizando concentrações de melaço acima de 20,5% v/v, sendo assim, a adição de nutrientes no meio à base de melaço para fermentações HG e VHG não se mostrou necessária;
- A aeração na fermentação NG em batelada alimentada de meio à base de melaço prejudicou o rendimento do processo, favorecendo o crescimento celular;
- As eficiências e produtividades encontrados foram muito relevantes para a fermentação HG com melaço de cana-de-açúcar utilizando cepa floculante. A fermentação VHG nas condições realizadas não apresentou bons resultados, provavelmente devido ao efeito sinérgico da inibição pela concentração de substrato e etanol;
- A máxima concentração de etanol (P'máx) alcançada pela *Saccharomyces cerevisiae* C2/00 em solução aquosa de melaço de cana-de-açúcar foi de 105,35 g/L. Para aumentar a concentração de etanol final nos processos fermentativos outras estratégias devem ser adotadas para que a levedura consiga suportar maiores concentrações de etanol;
- O modelo de Tosetto (2002) apresentou bom ajuste aos dados experimentais, tornando possível estimar os parâmetros cinéticos do processo em batelada alimentada.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o teor alcoólico máximo obtido para cada cepa floculante;
- Usar o melão no estudo da capacidade fermentativa;
- Estudar a influência da adição de nutrientes na fermentação HG e VHG no aumento de produtividade do processo;
- Analisar o tempo de alimentação do processo de fermentação VHG em batelada alimentada como forma de reduzir a inibição pelo substrato;
- Estudar a influência da microaeração no final da fermentação HG e VHG;
- Analisar a produção máxima de etanol ( $P'_{m\acute{a}x}$ ) pela levedura floculante C2/00 em temperaturas mais baixas.

## REFERÊNCIAS

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

ALI, H. K. Q.; ZULKALI, M. M. D. Ethanol Production from Date Syrup with Flocculent Yeast: Optimization Study. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.32, p. 818-823, 2013. <https://doi.org/10.1002/ep.11641>

AMORIM, H. B.; LORENZI, M. S.; PAULILLO, S. C. L.; LOPES, M. L.; GIOMETTI, F. H.; FERREIRA, G. **Novos Paradigmas na Produção de Etanol**. Fermentec, 2018. Disponível em: <<http://fermentecnews.com.br/2018/09/05/novos-paradigmas-na-producao-de-etanol/>>. Acesso em: 30 abr 2019.

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial**. 1994. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – What Has Brazil Learned About Yeasts Inhabiting the Ethanol Production Processes from Sugar Cane? In: BERNARDES, M. A. S. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Croatia: Intech, 2011, p. 67-84. <https://doi.org/10.5772/16572>

ANDRIETTA, S. R., MIGLIARI, P. C., ANDRIETTA, M. G. S. Classificação de Cepas de Levedura de Processos Industriais de Fermentação Alcoólica utilizando Capacidade Fermentativa. **STAB- Açúcar e Álcool e Subprodutos**, v.17, p. 54-59, 1999.

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

ANP. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2018**. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Rio de Janeiro: ANP, 2018. Disponível em: <[http://www.anp.gov.br/images/publicacoes/anuario-estatistico/2018/anuario\\_2018.pdf](http://www.anp.gov.br/images/publicacoes/anuario-estatistico/2018/anuario_2018.pdf)>. Acesso em: 30 abr 2019.

APLEVICZ, K. S. **Identificação de Bactérias Lácticas e Leveduras em Fermento Natural obtido a partir de Uva e sua Aplicação em Pães**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

ARSHAD, M.; HUSSAIN, T.; IQBAL, M.; ABBAS, M. Enhanced Ethanol Production at Commercial Scale from Molasses using High Gravity Technology by Mutant *S. cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 403-409, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.003>

ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL, R.; MAUGERI, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 353-364, 2001. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:353>

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.89-105, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2<sup>a</sup> ed. New York, McGraw Hill, 1986. 984p.

BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. **Balanço Energético Nacional 2018: Ano base 2017**. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro: EPE, 2018. 294p. Disponível em: <[http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-303/topico-419/BEN2018\\_\\_Int.pdf](http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-303/topico-419/BEN2018__Int.pdf)>. Acesso em: 30 abr 2019.

BARBOSA, H. S.; SILVEIRA, E. A.; MIRANDA, M.; ERNANDES, J. R. Efficient Very-High-Gravity Fermentation of Sugarcane Molasses by Industrial Yeast Strains. **Institute of Brewing and Distilling**, v.122, p.329–333, 2016. <https://doi.org/10.1002/jib.317>

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Croatia: Intech, 2011, p. 85-100. <https://doi.org/10.5772/17047>

BAUER, F. F.; GOVENDER, P.; BESTER, M. C. Yeast Flocculation and its Biotechnological Relevance. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, p. 31-39, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2783-0>

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem Matemática e Simulação de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, v. 2, p. 123-178.

BRASSOLATTI, T. F. Z.; HESPANHOL, P. A. COSTA, M. A. B.; BRASSOLATTI, M. Etanol de Primeira e Segunda Geração. **Revista Interdisciplinar de Tecnologias e Educação**, IFSP *Campus* Boituva, 2016.

CAO, D.; TU, M.; XIE, R.; LI, J.; WU, Y.; ADHIKARI, S. Inhibitory Activity of Carbonyl Compounds on Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 918-926, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf405711f>

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, v. 2, p. 193-204.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, v. 2, p. 205-218.

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Gestão de resíduos**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 48 p.

COLOMBI, B. L.; ORTIZ, M. A.; ZANONI, P. R. S.; MAGALHÃES, W. L. E., TAVARES, L. B. B. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Engevista**, v. 19, p. 339-352, 2017. <https://doi.org/10.22409/engevista.v19i2.838>

CONAB - **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana de açúcar**. - Safra 2018/19, n. 4 – Quarto levantamento, abril de 2019. Brasília: Conab, v. 5, 2019.

COT, M; LORET, M. O.; FRANÇOIS, J.; BENBADIS, L. Physiological Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in Aerated Fed-batch Fermentation for High Level Production of Bioethanol. **FEMS Yeast Res**, v.7, p. 22–32, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00152.x>

CRUZ, M. L. **Avaliação das Condições de Processo na Resistência da Levedura ao Teor Final de Etanol na Fermentação Alcoólica**. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, 2015.

CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. 119f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, 2019. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.321>

DEESUTH, O.; LAOPAIBOON, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, L. Improvement of Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice under High Gravity and Very High Gravity Conditions: Effects of Nutrient Supplementation and Aeration. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 95–102, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.068>

DEESUTH, O.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. High Ethanol Production under Optimal Aeration Conditions and Yeast Composition in a Very High Gravity Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p.263–270, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.042>

EMBRAPA MEIO AMBIENTE. **Avaliação da Qualidade de Produtos à base de *Trichoderma***. Embrapa, Jaguariúna, SP, 2012. 45 p.

ENMC. **Biocombustíveis no Mundo**. Entidade Nacional para o Mercado de Combustíveis, 2017. Disponível em: <<http://www.enmc.pt/pt-PT/atividades/biocombustiveis/benchmarking/>>. Acesso em: 21 nov 2017.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, v. 2, p. 223-246.

FERMENTEC. **Ácido aconítico é o principal ácido da cana-de-açúcar.** Fermentec, 2012. Disponível em: < <http://fermentecnews.com.br/2012/07/17/acido-aconitico/>>. Acesso em: 30 abr 2019.

FERMENTEC. **Características da produção de etanol no Brasil.** Fermentec, 2018. Disponível em: < <http://fermentecnews.com.br/2018/01/18/caracteristicas-da-producao-de-etanol-no-brasil/>>. Acesso em: 30 abr 2019.

FERNANDES, G. S.; MARINHO, F. G.; REIS, B. M.; SILVA, U. A. R.; KRUPP, T.; FANTINELL JUNIOR, M.; MARINHO, C. B. G. Influência do Ácido Acético no Processo de Fermentação Alcoólica. In: 19º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, 2019, São Luís, MA. **Anais...**

FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial.** 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, SP, 2013.

FERREIRA, E. **Contribuição para o Estudo da Otimização da Fermentação Alcoólica Operando em Batelada.** 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2005.

FINGUERUT, J.; MEIRELLES, A. J. A.; GUIRARDELLO, R.; COSTA, A. C. Fermentação, Hidrólise e Destilação. In: CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para Energia.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2008, p. 1435-474.

FORNAIRON-BONNEFOND, C.; DEMARETZ, V.; ROSENFELD, E.; SALMON, J. M. Oxygen Addition and Sterol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 176-182, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80011-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80011-1)

GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate I. Batch versus Continuous Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, p. 1387-1400, 1979. <https://doi.org/10.1002/bit.260210807>

GILL, S. A process for the step-by-step integration of differential equations in an automatic digital computing machine. **Proc. Cambridge Philos. Soc.**, v. 47, p. 96-108, 1951. <https://doi.org/10.1017/S0305004100026414>

GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, L. Plasmid-mediate transfer of *FLO1* into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation-sedimentation. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 162–168, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.089>

GONÇALVES, B. C. M.; CANILHA, L.; SANTOS, J. C.; SILVA, M. B.; SILVEIRA, J. L. Microalgas para Produção de Biohidrogênio e Biodiesel. **Janus**, n.21, p. 97-112, 2015.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregando *Saccharomyces cerevisiae* de Características Floculantes**. 2013. 148f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, 2013.

GUIDINI, C. Z.; SANTOS, L. D.; SILVA, H. A.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Alcoholic Fermentation with Flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in Fed-Batch Process. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, p. 1623-1638, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0646-8>

HAN, K.; LEVENSPIEL, O. Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 4, p. 430-447, 1988. <https://doi.org/10.1002/bit.260320404>

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, v. 2, p. 93-122.

JOANNIS-CASSAN, C.; RIESS, J.; JOLIBERT, F.; TAILLANDIER, P. Optimization of Very High Gravity Fermentation Process for Ethanol Production from Industrial Sugar Beet Syrup. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 165-173, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.027>

KAWA-RYGIELSKA, J; PIETRZAK, W. Ethanol Fermentation of Very High Gravity (VHG) Maize Mash by *Saccharomyces cerevisiae* with spent Brewer's Yeast Supplementation. **Biomass and Bioenergy**, v.60, p. 50-57, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.10.028>

LEAL, M. R. L. V; TARÁNTOLA, F.; ROGGIERO, A.; CASTRO, D.; CORTEZ, L. A. B. Produção de Etanol em Regiões Semi-Áridas. In: CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para Energia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2008, p. 113-131.

LEVENSPIEL, O. The Monod equation: a Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p. 1671-1687, 1980. <https://doi.org/10.1002/bit.260220810>

LI, Z.; WANG, D.; SHI, Y. C. Effects of Nitrogen Source on Ethanol Production in Very High Gravity Fermentation of Corn Starch. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 229-235, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.10.055>

LIU, C. G.; HAO, X. M.; LIN, Y. H.; BAI, F. W. Redox Potential Driven Aeration During Very-High-Gravity Etanol Fermentation by Using Flocculating Yeast. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep30995>

LIU, C. G.; WANG, N.; LIN, Y. H.; BAI, F. W. Very high gravity ethanol fermentation by flocculating yeast under redox potential-controlled conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-61>

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, v. 3, p. 1-43.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP P. V., CLARK D. P. **Microbiologia de Brock**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2010.

MARTINEZ, M. E. M.; REIS, P. C.; SANTOS, D. A.; SCHMIDELL NETTO, W. Estudo da Fermentação Submersa não Aerada por *Saccharomyces cerevisiae* para Determinação dos Parâmetros de Consumo de Glicose e Produção de Glicerol e Etanol. **Eclética Química**, v. 39, p. 91-106, 2014. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v39.1.2014.p91-106>

MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H.; UEDA, M.; TANAKA, A.; KONDO, A. Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4517 – 4522, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4517-4522.2002>

MEIRELES, M. A. A; PEREIRA, C. G. **Fundamentos da Engenharia de Alimentos**. Volume 6. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

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

MIKI, B. L. A.; POON, N. H.; JAMES, A. P.; SELIGY, V. L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Bacteriology**, v. 150, p. 878–889, 1982. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025382-4.50035-6>

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 171-177, 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000090>

NELDER, J. A.; MEAD, R. A. Simplex Method for Function Minimization. **Computer Journal**, v. 7, p. 308-313, 1965. <https://doi.org/10.1093/comjnl/7.4.308>

NICOLA, G. Di; SANTECCHIA, E.; SANTORI, G.; POLONARA, F. Advances in the Development of Bioethanol: A Review. In: BERNARDES, M. A. S. **Biofuel's Engineering Process Technology**. Croatia: Intech, 2011, p. 611-638. <https://doi.org/10.5772/22510>

NOGUEIRA, P. P. D. **Peptídeos antimicrobianos aplicados no controle da contaminação bacteriana na produção de bioetanol**. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

NOVACANA. **Produção mundial de biocombustíveis avança 3,2% em 2017, diz BP**. Novacana, 2018. Disponível em: < <https://www.novacana.com/n/internacional/producao-mundial-biocombustiveis-avancou-3-2-2017-200718>>. Acesso em: 30 abr 2019.

ORTIZ, S., SIMIONATTO, E. L., BARROS, A. A. C. Avaliação da Capacidade Fermentativa e do Crescimento Celular da Levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT-3174. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Florianópolis, Santa Catarina, 2014. **Anais...** <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1914-16901-177806>

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com Leveduras de Características Floculantes em Reator tipo Torre com Escoamento Ascendente**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PACHECO, T. F. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Embrapa – Circular Técnica 4, Brasília, DF, 2011.

PĂTRAȘCU, E.; RĂPEANU, G.; BONCIU, C.; HOPULELE, T. Comparative study of the multiplication and fermentation yields by using different *Saccharomyces* yeast strains to ethanol production. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 16, p. 289-293, 2010.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Optimization of Low-cost Medium for Very High Gravity Ethanol Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using Statistical Experimental Designs. **Bioresource Technology**, v.101, p.7856-7863, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.082>

PERNA, M. S. C. **Efeito do ácido acético sobre o crescimento e fermentação da levedura *Meyerozyma guilliermondii***. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

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, 2017a. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.005>

PHUKOETPHIM, N.; SALAKKAM, A.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Kinetic models for batch ethanol production from sweet sorghum juice under normal and high gravity fermentations: Logistic and modified Gompertz models. **Journal of Biotechnology**, v. 243, p. 69-75, 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.012>

PICAZO-ESPINOSA, R.; GONZALEZ-LOPEZ, J; MANZANERA, M. Bioresources for Third-Generation Biofuels. In: BERNARDES, M. A. S. **Biofuel's Engineering Process Technology**. Croatia: Intech, 2011, p. 115-140. <https://doi.org/10.5772/17134>

PINHEIRO, A. D. T; PEREIRA, A. S.; BARROS, E. M.; ANTONINI, S. R. C.; CARTAXO, S. J. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Mathematical Modeling of the Ethanol Fermentation of Cashew Apple Juice by a Flocculent Yeast: The Effect of Initial Substrate Concentration and Temperature. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 40, p. 1221-1235, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1782-2>

PRADEEP, P.; REDDY, O. V. S. High Gravity Fermentation of Sugarcane Molasses to Produce Ethanol: Effect of Nutrients. **Indian J Microbiol**, v. 50, p. 82-87, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0006-0>

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

RIVERA, E. C.; YAMAKAWA, C. K.; SAAD, M. B. W.; ATALA, D. I. P.; AMBROSIO, W. B.; BONOMI, A.; NOLASCO JUNIOR, J.; ROSSELL, C. E. V. Effect of Temperature on Sugarcane Ethanol Fermentation: Kinetic Modeling and Validation under Very-High-Gravity Fermentation Conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.119, p. 42–51, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.002>

ROSSELL, C. E. V.; NOLASCO JUNIOR, J.; YAMAKAWA, C. K. **Processo e equipamento para fermentação contínua multiestagio com recuperação, reativação e reciclo de fermento para obtenção de vinhos com alto teor alcoólico**. Depositante: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. WO2014078924-A1. Depósito: 22 nov. 2013. Concessão: 30 mai. 2014.

SANTOS, L. D. **Fermentação Alcoólica Empregando Leveduras Flocculantes em Sistema de Reatores Torre**. 2014. 148f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, 2014.

SANTOS, L. D.; SOUSA, M. D. B.; GUIDINI, C. Z.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Continuous Ethanol Fermentation in Tower Reactors with Cell Recycling Using Flocculent *Saccharomyces Cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1725-1729, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.020>

SHALABY, E. A. Biofuel: Sources, Extraction and Determination. In: FANG, Z. **Liquid, Gaseous and Solid Biofuels - Conversion Techniques**. Croatia: Intech, 2013, p. 451-478. <https://doi.org/10.5772/51943>

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>

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; PINTO, C. E. M.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO<sub>2</sub> Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling. **Energy Fuels**, v. 30, p. 748-757, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02320>

SOUZA, L. S. S. **Avaliação do Processo de Produção de Etanol pela Fermentação do Caldo de Mandiocaba (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

STECKELBERG, C. **Caracterização de Leveduras de Processos de Fermentação Alcoólica Utilizando Atributos de Composição Celular e Características Cinéticas**. 2001. 215f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STHEL, M. S.; ROCHA, A. M.; TAVARES, J. R.; MOTHÉ, G. A.; COUTO, F.; CASTRO, M. P. P.; PEREZ, V. H.; SILVA, M. G.; VARGAS, H. Evaluation of Gaseous Emission in the Use of Biofuels in Brazil. In: FANG, Z. **Biofuels - Economy, Environment and Sustainability**. Croatia: Intech, 2013, p. 303-324. <https://doi.org/10.5772/52773>

STRATFORD, M. Yeast Flocculation: Calcium Specificity. **Yeast**, v. 5, p. 487-496, 1988. <https://doi.org/10.1002/yea.320050608>

THOMAS, K. C.; DHAS, A.; ROSSNAGEL, B. G.; INGLEDEW, W. M. Production of Fuel Alcohol from Hull-less Barley by Very High Gravity Technology. **Cereal Chemistry**, v. 72, p. 360-364, 1995.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1616–1623, 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1616-1623.2002>

TOFALO, R. PERPETUINI, G.; GIANVITO, P. D.; SCHIRONE, M.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Genetic Diversity of FLO1 and FLO5 Genes in Wine Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.191, p. 45-52, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.028>

TOSETTO, G. M. **Influência da Matéria-Prima no Comportamento Cinético de Levedura na Produção de Etanol**. 2002. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

UNICA. **Competitivo na bomba, etanol é preferência dos brasileiros na hora de abastecer**. União da Indústria de Cana de Açúcar, 2018a. Disponível em: <[unica.com.br/noticia/6537316920342041397/competitivo-na-bomba-por-cento2C-etanol-e-preferencia-dos-brasileiros-na-hora-de-abastecer/](http://unica.com.br/noticia/6537316920342041397/competitivo-na-bomba-por-cento2C-etanol-e-preferencia-dos-brasileiros-na-hora-de-abastecer/)>. Acesso em: 30 abr 2019.

UNICA. **Emissões de CO<sub>2</sub> evitadas pelo uso de etanol batem recorde no Brasil**. União da Indústria de Cana de Açúcar, 2018b. Disponível em: <[unica.com.br/noticia/37651947920313548097/emissoes-de-co2-evitadas-pelo-uso-de-etanol-batem-recorde-no-brasil/](http://unica.com.br/noticia/37651947920313548097/emissoes-de-co2-evitadas-pelo-uso-de-etanol-batem-recorde-no-brasil/)>. Acesso em: 30 abr 2019.

UNICA. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2017/2018**. União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2019. Disponível em: <[www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem](http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem/)>. Acesso em: 30 abr 2019.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

VIEGAS, M. C. **Desenvolvimento de um Reator de Bancada de Leito Fluidizado para Produção de Etanol Utilizando Linhagens de Leveduras Flocculantes**. 1999. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

**YAMAKAWA, C. K. Avaliação da Fermentação Alcoólica com Reciclo de Células de Hidrolisado Celulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar em Unidade Integrada e Autônoma.** 2016. 269f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Yeast Flocculation: New Story in Fuel Ethanol Production. **Biotechnology Advances**, v.27, p.849-856, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.006>