



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

ANA CAROLINA TOLENTINO BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM
CONDIÇÕES DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES
EMPREGANDO LEVEDURAS DE CARACTERÍSTICAS
FLOCULANTES**



ANA CAROLINA TOLENTINO BRANDÃO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM
CONDIÇÕES DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES
EMPREGANDO LEVEDURAS DE CARACTERÍSTICAS
FLOCULANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia Química, da Universidade Federal de Uberlândia como exigência para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área: Bioprocessos

Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam Maria de Resende

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B817 2019	<p>Brandão, Ana Carolina Tolentino, 1989- AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM CONDIÇÕES DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES EMPREGANDO LEVEDURAS DE CARACTERÍSTICAS FLOCULANTES [recurso eletrônico] / Ana Carolina Tolentino Brandão. - 2019.</p> <p>Orientador: Eloízio Júlio Ribeiro. Coorientador: Miriam Maria de Resende. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2248 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Engenharia química. I. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1952-, (Orient.). II. Resende, Miriam Maria de, 1971-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título.</p> <p>CDU: 66.0</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM CONDIÇÕES DE
ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES EMPREGANDO LEVEDURAS DE
CARACTERÍSTICAS FLOCULANTES

Dissertação aprovada para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal
de Uberlândia pela banca examinadora
formada por:

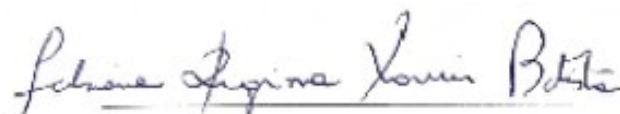
Uberlândia, dia 24 de julho de 2019.



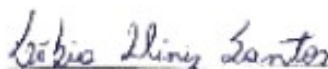
Prof. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro (orientador), FEQUI/UFU



Prof.ª Dr.ª Miriam Maria de Resende (coorientadora), FEQUI/UFU



Prof.ª Dr.ª Fabiana Regina Xavier Batista, FEQUI/UFU



Prof.ª Dr.ª Líbia Diniz Santos, PPGA/UFU



Prof.ª Dr.ª Bruna Vieira Cabral, UFTM.

Dedico este trabalho aos meus pais:
LUIZ CLAUDIO E ROSSANA, e minha
irmã: **ANA CLAUDIA** que com
simplicidade e amor sempre me deram
suporte em todos os momentos da minha
vida.

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus, fonte de toda a sabedoria; fortaleza e direcionamento.

A meus pais, por existirem. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês. Agradeço pelos conselhos, ensinamentos e por tudo que tem feito por mim. Vocês são meu maior incentivo. Minha vida! A minha irmã, Ana Cláudia, pelo companheirismo, amizade e por ser minha inspiração de superar os desafios a cada dia. Vocês são muito especiais. Quero dividir com vocês os méritos dessa conquista.

Em especial, agradeço aos meus orientadores, Eloízio e Miriam, pela paciência, e confiança em mim depositada e pelo incentivo, discussões e profissionalismo no desenvolvimento do trabalho.

A minha família e meus amigos por sempre estarem ao meu lado e me proporcionarem momentos alegres e divertidos.

A Cordelucia e família, Dona Dinalva e Sr. Valter e as meninas do pensionato pela receptividade, carinho e amizade.

A minha turma de mestrado (Só quem anima; A nata), pela amizade construída na pós-graduação, e pelos momentos de resenha, diversão e companheirismo.

A todos os mestrandos, doutorandos, funcionários, professores do NUCBIO e alunos de IC, pela companhia, ajuda, pelo carinho e pelas longas horas de jornada de trabalho com bom humor e motivação.

À UFU, CAPES e FAFEMIG.

Enfim, a todos que colaboraram de alguma forma para o bom desenvolvimento deste trabalho.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.” **(Mahatma Gandhi)**

RESUMO

Com a expansão da produção de etanol nas destilarias brasileiras, a incorporação de novas tecnologias no processo fermentativo vem se tornando essencial para elevar o potencial de produção do etanol e minimizar os impactos gerados, principalmente no que diz respeito à redução do volume da vinhaça. Uma tecnologia que tem despertado bastante interesse é a fermentação *Very High Gravity* (VHG), a qual envolve a preparação de meios com altas concentrações de açúcares. Esta tecnologia tem como vantagens em relação as abordagens convencionais, mostos com altos teores alcoólicos, minimização de custos de produção e redução do volume de vinhaça. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência conjunta da temperatura, concentração de açúcar e concentração celular no reator em processo batelada, empregando a cepa C2/00 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de característica floculante, utilizando um Delineamento Composto Central (DCC). As condições adotadas pelo DCC foram: temperatura (21-29°C), Concentração de açúcar (240-320g/L) e concentração celular (12-30%v/v). Os ensaios foram realizados em *shaker* sob controle de temperatura e rotação, utilizando meio sintético à base de açúcar e extrato de levedura. As fermentações foram acompanhadas ao longo do tempo pelas medidas de concentrações de açúcares e etanol durante 24 horas de fermentação. E a viabilidade celular foi analisada no início e fim da fermentação. As faixas das variáveis analisadas no DCC que maximizaram as respostas rendimento, concentração celular e produtividade e minimizaram a resposta açúcar residual foram temperatura de 25-29°C, concentração de ART inicial de 260-310g/L e concentração celular de 22-30% (v/v). Foi observado que utilizando as condições geradas pelo *Statistica*® para a validação, os modelos obtidos pelas superfícies de respostas e curvas de contorno, apresentaram boa reprodutibilidade, pois os resultados experimentais foram semelhantes aos resultados preditos. As fermentações alcoólicas em batelada alimentada sob condições VHG forneceram teores alcoólico de 17,64-18,54°GL e rendimentos de 90,78-94,12%, satisfatórios quando comparados ao processo convencional e demais autores. A eficiência do processo em batelada alimentada com a reutilização de células se manteve relativamente constante, sendo que na 1ª fermentação a viabilidade foi de 84,85% enquanto a 2ª fermentação reutilizando as células da 1ª foi de 88,18%, evidenciando a possibilidade da reutilização em ciclos sucessivos em fermentações com altos teores alcoólicos.

Palavras chave: Biocombustíveis. Etanol. Fermentação VHG. Levedura floculante.

ABSTRACT

With the expansion of ethanol production in Brazilian distilleries, the incorporation of new technologies in the fermentation process has become essential in order to raise ethanol production potential and minimize the impacts generated, especially with regard to the reduction of vinasse volume. One technology that has attracted a lot of interest is Very High Gravity (VHG) fermentation, which involves the preparation of media with high concentrations of sugars. This technology has advantages over conventional approaches, musts with high alcohol content, minimization of production costs and reduction of vinasse volume. In this context, the objective of this work was to study the influence of temperature, sugar concentration and cell concentration on the batch reactor using *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain C2/00 using a Central Compound Designation (CCD). The conditions adopted by CCD were: temperature (21-29°C), sugar concentration (240-320g/L) and cell concentration (12-30%v/v). The tests were carried out in shaker under temperature and rotation control, using synthetic medium sugar and yeast extract. The fermentations were monitored over time by the measurements of sugars and ethanol concentrations during 24 hours of fermentation. And cell viability was analyzed at the beginning and end of the fermentation. The ranges of the variables analyzed in the CCD that maximized yield, cell concentration and productivity responses and minimized the residual sugar response were temperature of 25-29°C, initial TRS concentration of 260-310 g/L and cellular concentration of 22-30% (v/v). It was observed that using the conditions generated by *Statistica*® for the validation, the models obtained by the surfaces of responses and contour curves, presented good reproducibility, since the experimental results were similar to the predicted results. The batch alcoholic fermentations in a fed under VHG conditions provided alcoholic contents of 17.64-18.54°GL and yields of 90.78-94.12% satisfactory when compared to the conventional process and other authors. The efficiency of the batch process fed with cell reuse remained relatively constant, and in the 1st fermentation the viability was 84.85% while the 2nd fermentation reusing the 1st cells was 88.18%, evidencing the possibility of reuse in successive cycles in fermentations with high alcohol content.

Keywords: Biofuels. Ethanol. VHG Fermentation. Flocculant yeast.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ART – Açúcares Redutores Totais

CEO – Chief Executive Officer – Diretor Executivo

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CNPq – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CPQBA – Centro de Pesquisas Pluridisciplinar

CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

DCC – Delineamento de Composto Central

FEQ – Faculdade de Engenharia Química

HPLC – High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de alta Eficiência.

IEA – Agência Internacional de Energia

pH – Potencial Hidrogeniônico

RID – Detector de Índice de Refração

R² – Coeficiente de Determinação

VHG – *Very High Gravity* – Altas concentrações de açúcares

°Brix – Escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis

T – Temperatura

S₀ – Concentrações de Açúcares (ART) corresponde à concentração inicial em um processo operado em batelada.

X₀ – Concentração celular inicial correspondente à concentração inicial em um processo operado em batelada.

Lista de Ilustrações

Figura 3.1 – Evolução da produção de Etanol total.....	6
Figura 3.2 – Ampliação da produção de etanol no Brasil.	7
Figura 3.3 – Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica.	9
Figura 3.4 – Células floculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observadas ao olho nu.....	10
Figura 3.5 – Processo em batelada.	16
Figura 3.6 – Processo em batelada alimentada.....	17
Figura 3.7 – Processo Contínuo.....	19
Figura 4.1 – Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.	20
Figura 4.2 – Câmara de Neubauer.	22
Figura 4.3 –HPLC utilizado nas análises das amostras durante a fermentação.	23
Figura 4.4 – Fermentador <i>New Brunswick</i> em batelada alimentada.....	28
Figura 5.1 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o rendimento (%) em função da concentração celular e temperatura.....	32
Figura 5.2 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o rendimento (%) em função da concentração substrato e temperatura.	32
Figura 5.3 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o rendimento (%) em função da concentração substrato e concentração celular.	33
Figura 5.4 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de etanol (g/L) em função da concentração celular e temperatura.....	35
Figura 5.5 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de etanol (g/L) em função da concentração substrato e temperatura.	36
Figura 5.6 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para concentração de etanol (g/L) em função da concentração substrato e concentração celular.	36
Figura 5.7 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produtividade ($g_{\text{etanol}}/L.h$) em função da concentração celular e temperatura.	39
Figura 5.8 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produtividade ($g_{\text{etanol}}/L.h$) em função da concentração substrato e temperatura.	39
Figura 5.9 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produtividade ($g_{\text{etanol}}/L.h$) em função da concentração substrato e concentração celular.....	40
Figura 5.10 - Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração celular e temperatura.	42

Figura 5.11- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração substrato e temperatura	43
Figura 5.12- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração substrato e concentração celular.	43
Figura 5.13 – Perfis da função <i>Desirability</i> para 12 horas de fermentação.....	46
Figura 5.14 - Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento (%) em função da concentração celular e temperatura.....	49
Figura 5.15- Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento (%) em função da concentração de substrato e temperatura.	49
Figura 5.16- Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento (%) em função da concentração de substrato e concentração celular.....	50
Figura 5.17 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol (g/L) em função da concentração celular e temperatura.	52
Figura 5.18- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol (g/L) em função da concentração substrato e temperatura.	52
Figura 5.19- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol (g/L) em função da concentração celular e concentração substrato.....	53
Figura 5.20- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta produtividade (g/L.h) em função da concentração celular e temperatura.....	55
Figura 5.21- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta produtividade (g/L.h) em função da concentração substrato e temperatura	55
Figura 5.22- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta produtividade (g/L.h) em função da concentração celular e concentração substrato.	56
Figura 5.23- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração celular e temperatura.....	58
Figura 5.24- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração substrato e temperatura.	59
Figura 5.25- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração celular e concentração substrato.	59
Figura 5.26 – Perfis da função <i>Desirability</i> para 24 horas de fermentação.....	61
Figura 5.27 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 1ª validação a 20°C.	63
Figura 5.28 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 1ª validação a 27°C.	63

Figura 5.29 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 2ª validação a 20°C.	64
Figura 5.30 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 2ª validação a 27°C.	64
Figura 5.31 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 3ª validação.	65
Figura 5.32 – Perfis de concentração de açúcares (▽) e concentração de etanol (■) em função do tempo para a 1ª fermentação em batelada alimentada.	67
Figura 5.33 – Perfis de concentração de açúcares (▽) e concentração de etanol (■) em função do tempo para a 2ª fermentação em batelada alimentada	68
Figura 5.34 – Perfis de concentração de açúcar residual redutor total – ART (▽) e concentração de etanol (■) em função do tempo para a fermentação realizada em batelada alimentada com tempo de alimentação de 4h.	69

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Matriz do delineamento composto central.....	25
Tabela 5.1 – Valores codificados e nominais e suas respostas em 12 horas de fermentação...	30
Tabela 5.2 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 em 12h.....	31
Tabela 5.3 – Coeficientes de regressão múltipla para a resposta Y_2 em 12h.	34
Tabela 5.4 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_3 em 12h.....	38
Tabela 5.5 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_4 em 12h.....	41
Tabela 5.6 – Valores ótimos para o tempo de 12 horas de fermentação.	44
Tabela 5.7 – Valores codificados e nominais e suas respostas em 24 horas de fermentação...	47
Tabela 5.8 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 para 24h.....	48
Tabela 5.9 - Coeficientes de regressão para a resposta Y_2 em 24h.	51
Tabela 5.10 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_3 em 24h.....	54
Tabela 5.11 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_4 em 24h.....	57
Tabela 5.12 – Valores ótimos para os tempos de 24 horas de fermentação.	60
Tabela 5.13 – Condições experimentais para as validações.....	62
Tabela 5.14 – Valores experimentais e preditos para as validações.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Geral	4
2.2	Específicos.....	4
3	FUNDAMENTOS E REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	Etanol.....	5
3.2	Fermentação Alcoólica	8
3.2.1	Leveduras Floculantes.....	9
3.3	Fermentação em VHG	11
3.4	Fatores que afetam a fermentação alcoólica	12
3.4.1	Temperatura	12
3.4.2	pH.....	13
3.4.3	Fatores de estresse (etanol e substrato)	14
3.4.4	Processos de Fermentação.....	15
3.4.4.1	Batelada.....	15
3.4.4.2	Batelada Alimentada	17
3.4.4.3	Contínuo.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Materiais	20
4.1.1	Local de execução da pesquisa.....	20
4.1.2	Levedura Floculante.....	20
4.1.3	Cultivo.....	21
4.1.4	Meio de fermentação.....	21
4.2	Métodos Analíticos.....	21
4.2.1	Viabilidade Celular	21
4.2.2	Análises das concentrações de açúcares e álcool	22
4.2.3	Cálculos das respostas relacionadas às fermentações	23
4.2.3.1	Rendimento	23
4.2.3.2	Produtividade	24
4.2.4	Metodologia Experimental.....	24
4.2.4.1	Planejamento experimental	24
4.2.4.2	Experimentos de validação.....	27
4.2.4.3	Processo batelada alimentada.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Delineamento composto central	29
5.1.1	DCC para 12 horas de fermentação.....	29

5.1.1.1	Rendimento (Y_1).....	30
5.1.1.2	Concentração de etanol (Y_2).....	34
5.1.1.3	Produtividade (Y_3).....	37
5.1.1.4	Açúcar residual (Y_4).....	41
5.1.2	DCC para 24 horas de fermentação.....	46
5.1.2.1	Rendimento (Y_1).....	47
5.1.2.2	Concentração de etanol (Y_2).....	51
5.1.2.3	Produtividade (Y_3).....	54
5.1.2.4	Açúcar residual (Y_4).....	57
5.2	Experimentos de validação	62
5.3	Experimento em reator batelada alimentada.....	67
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	71
6.1	Conclusões.....	71
6.2	Sugestões para Trabalhos Futuros	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUÇÃO

É inegável que o petróleo foi a fonte de energia mais importante durante todo o século XX. Sua descoberta, em 1859, proporcionou inúmeros avanços tecnológicos e foi responsável pelo desenvolvimento, por exemplo, de uma revolução nos meios de locomoção. Porém, devido a preocupação em reduzir a emissão dos gases dos efeitos estufa, responsáveis pelo aquecimento global, tem-se buscado a substituição dos combustíveis fósseis por novas fontes de energia mais limpa e que permitam um desenvolvimento sustentável (AZEVEDO et al., 2012).

Nesse contexto, entre as fontes alternativas de combustível, o etanol é o biocombustível mais utilizado em veículos automotores e uma fonte de energia renovável que pode substituir parcialmente os combustíveis fósseis. O uso desse biocombustível tem como vantagem a redução na emissão dos gases do efeito estufa em 84% em comparação a gasolina. Entre os biocombustíveis à base de produtos agrícolas desenvolvidos em larga escala se destaca o etanol desenvolvido a partir de cana-de-açúcar e do milho (SANTOS et al., 2008; GOLDENBERG e GUARDABASSI, 2010).

O Brasil, por ser um país de extensão continental e com um clima propício para o cultivo da cana-de-açúcar, desponta como maior detentor mundial de tecnologias para a produção de etanol, sendo que sua utilização como combustível foi uma inovação brasileira, desenvolvida com objetivo de diminuir a dependência frente ao petróleo. E para a sua inserção no mercado de combustíveis brasileiro, em 1975 o governo lança o PROÁLCOOL- Programa Nacional do Alcool, que fomentou a criação de indústrias e o desenvolvimento de pesquisas capazes de tornar viável o uso do álcool como combustível nos motores à explosão (CASTRO, 2017).

Atualmente, os EUA e o Brasil são os maiores produtores de etanol do mundo. Juntos, ambos os países representam mais de 94 bilhões de litros de etanol produzidos por ano, representando cerca de 85% da produção mundial. O Brasil já vem, por muitas décadas, utilizando o etanol como combustível ou sob a forma de uma mistura de 27% na gasolina, colocando o país em uma posição extremamente favorável internacionalmente, em termos de emissão de CO₂ (BERTRAND et al., 2016).

Os principais processos de fermentação alcoólica utilizados pelas destilarias brasileiras são o sistema em batelada alimentada e a fermentação contínua, ambos com reciclo de

leveduras. Cerca de 85% dos processos industriais de fermentação alcoólica para produção de álcool combustível no país estão estabelecidos com base em processos de batelada alimentada, enquanto que o restante são fermentações contínuas (AMORIM et al., 2008).

Nos processos convencionais os mostos apresentam concentrações de açúcares em torno de 20°Brix (equivalente a 180 g/L), levando a uma produção de vinho com baixo teor alcoólico (8 a 10°GL), gerando assim durante o processo de destilação cerca 12 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido. O grande volume gerado, devido à baixa concentração de etanol no vinho, pode gerar impacto ambiental (contaminação dos lençóis freáticos, rios), social (mau cheiro) e econômico (alto custo no processo de destilação, transporte e armazenamento) (BASSO et al., 2011).

Dessa forma, várias pesquisas na linha de processo de produção de etanol têm sido cruciais para a evolução das indústrias alcooleiras no Brasil. Dos avanços tecnológicos mais atuais no campo de produção de etanol, uma abordagem que tem despertado interesse é a introdução de meios contendo altas concentrações de açúcares (>250 g/L), intitulada como VHG (*Very High Gravity*). Trata-se de um processo que possui ganho de eficiência de até 7%, voltada à obtenção de vinhos de alto teor alcoólico 15% (v/v), redução na geração de vinhaça e minimização na contaminação bacteriana (CTBE, 2014).

No entanto, as células de leveduras são submetidas a uma variedade de estresses sob duras condições associadas a fermentação. O açúcar elevado no meio causa um aumento da pressão osmótica, que tem um efeito prejudicial sobre as células além do estresse etanólico, gerado no final do processo, devido a altas concentrações de etanol produzido (PEREIRA et al., 2010). A fermentação VHG tem um grande potencial para produção de etanol, mas isso somente se torna possível desde que as condições ambientais e nutricionais sejam adequadas para que as leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*) possam produzir e tolerar altas concentrações do processo (WATANABE et al., 2017).

E para tanto, fermentações com temperaturas inferiores às utilizadas nos processos convencionais, aumentam a resistência do microrganismo ao etanol, mas retarda a cinética da reação, devido a alterações fisiológicas da célula que afetam a membrana celular e atividades metabólicas enzimáticas envolvendo reações bioquímicas (DEED et al., 2015). No entanto, existem benefícios na obtenção de um vinho com alto teor alcoólico, juntamente com um menor volume de vinhaça e menor consumo de vapor durante a destilação (DIAS et al., 2012).

Na produção de etanol via fermentação, logo após a o término da fermentação é necessário a separação dos microrganismos (leveduras) do vinho. A forma mais convencional

de promover a separação é uso de centrífugas, já que a sedimentação natural se torna inviável devido à questão tempo (na centrifugação a deposição das células chega a ser 6000 vezes mais rápida em relação à sedimentação natural) (HIDZIR et al, 2014; ROKEM e GREENLATT, 2015).

Entretanto, os altos investimentos de capital e o elevado custo energético de operação das centrífugas usadas nesse processo, entravam sua aplicação em plantas químicas produtoras de etanol, especialmente em países em desenvolvimento, onde o custo energético é relativamente alto. Desde então, o ramo sucroenergético brasileiro tem investido na produção de novos conhecimentos e inovações tecnológicas.

Com o objetivo de proporcionar redução no custo de produção das usinas sucroalcooleiras instaladas no país, pesquisadores conseguiram selecionar com sucesso linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com capacidade floculante (cresce de maneira agrupada, formando flocos e concentra-se no fundo do reator). A vantagem dessas leveduras sobre as tradicionalmente empregadas é que elas dispensam a etapa da centrifugação, que ocorre após a fermentação. E estima-se que a eliminação da etapa de centrifugação gere uma economia no custo do processamento, já que poupa investimento na sua aquisição e manutenção das centrífugas, bem como consumo de energia para a operação das mesmas, sendo assim uma operação considerada ambientalmente correta. (VASCONCELOS, 2007; CHOI et al., 2010).

Portanto, para se garantir uma produção limpa e renovável, necessita-se de inovações tecnológicas e redução de custos no processo. Diante desse contexto, o presente trabalho estudou a influência de temperaturas baixas ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) em fermentações VHG empregando leveduras floculantes com altas densidades celulares.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a fermentação alcoólica em altas concentrações de açúcar empregando levedura flocculante (C2/00).

2.2 Específicos

Os objetivos específicos foram:

- (i) Estudar a influência da temperatura, da concentração de substrato (ART) e da concentração celular na fermentação em VHG em processo batelada empregando a cepa C2/00 de característica flocculante;
- (ii) Avaliar a fermentação alcoólica em reator do tipo batelada alimentada com altas concentrações de substrato (VHG) sob condições otimizadas;
- (iii) Avaliar a reutilização da cepa decantada na batelada alimentada no processo VHG.

3 FUNDAMENTOS E REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Etanol

O etanol é um composto orgânico de fórmula C_2H_6O , que apesar de estar presente em diversos produtos do cotidiano, ainda é mais utilizado, atualmente como combustível. Em sua aplicação como combustível, o etanol está presente de forma pura ou misturado à gasolina. O etanol comum vendido nos postos é o álcool etílico hidratado, uma mistura com cerca de 96% de etanol e o restante de água. Já o misturado a gasolina é o álcool anidro, um tipo de etanol que possui pelo menos 99,6% de álcool puro. Na gasolina brasileira a proporção de etanol misturado ao combustível, é de 27% (NOVACANA, 2013; MME, 2015).

O etanol obtido de vegetais é considerado um combustível renovável, ou seja, não se esgota. E também um combustível sustentável, pois grande parte do gás carbônico lançado na atmosfera em sua produção e pelos carros é absorvida pela própria cana-de-açúcar durante a fotossíntese. É calculado que o etanol reduz entre 40 e 62% a emissão de gases de efeito estufa se comparado a gasolina. Além disso, ele lança menos gases poluentes em comparação com os combustíveis derivados do petróleo, o que o torna um dos mais viáveis ecologicamente (WANG et al., 2012; LOPES et al., 2016).

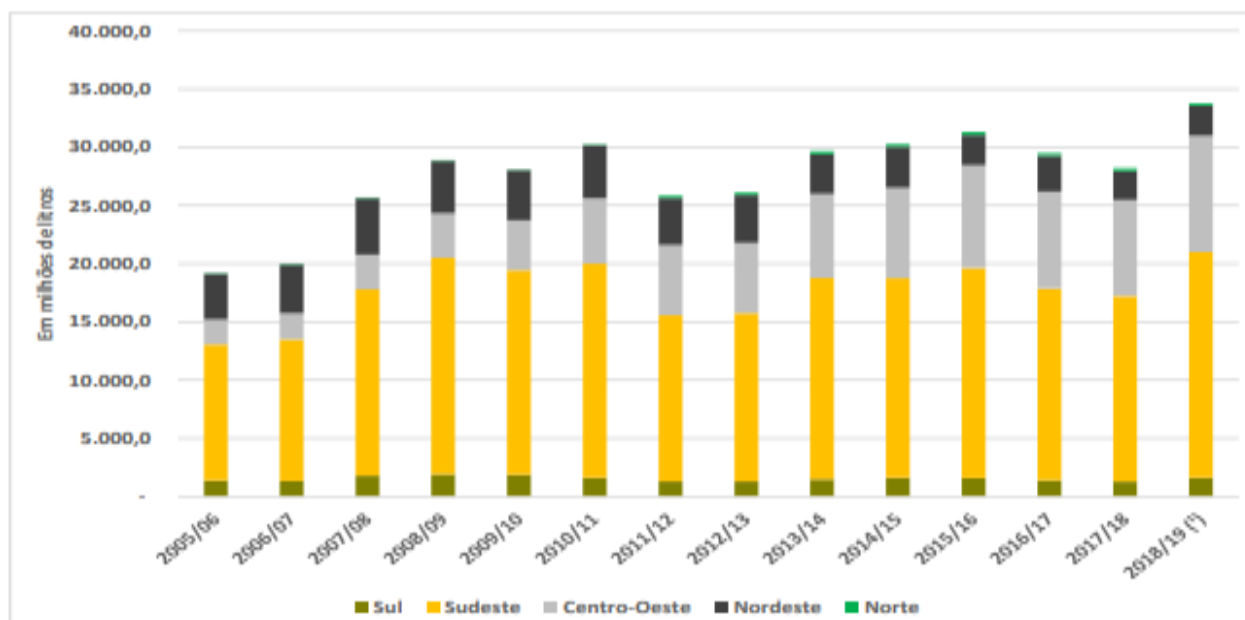
Nesse cenário, o Brasil vem se destacando com a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. E é um dos principais produtores de biocombustíveis no mundo, ao lado dos Estados Unidos. Com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 1975, o país não apenas reduziu os gastos com a importação do petróleo como também estimulou a produção de cana. A produção aumentou de 88,9 milhões de toneladas, em 1975, para 588,5 milhões em 2013, o que permitiu que a produção de etanol crescesse de 555 milhões de litros para 23,2 bilhões de litros no mesmo período (MORAES et al., 2015).

O Proálcool trouxe outros benefícios diretos, com a expansão do complexo sucroalcooleiro houve a geração de empregos e aumento na renda em vastas regiões do interior do país, enquanto as plantas dedicadas ao refino de petróleo sempre se concentraram em poucas cidades litorâneas (PULS, 2016).

Atualmente, com os preços de açúcar em queda no mercado internacional, e um cenário mais favorável para o etanol no mercado interno, alta do dólar e do petróleo, as unidades de produção concentraram sua atenção na produção de etanol. No quarto e último levantamento da safra 2018/19 a produção de cana-de-açúcar foi de 620,44 milhões de

toneladas para produzir 29,04 milhões de toneladas de açúcar, 33,14 bilhões de litros de etanol, um incremento de 21,7% ou 6,3 bilhões de litros em relação a safra de 2017/2018 que atingiu 27,7 bilhões de litro, conforme mostra a Figura 3.1 (CONAB, 2019).

Figura 3.1 – Evolução da produção de Etanol total.



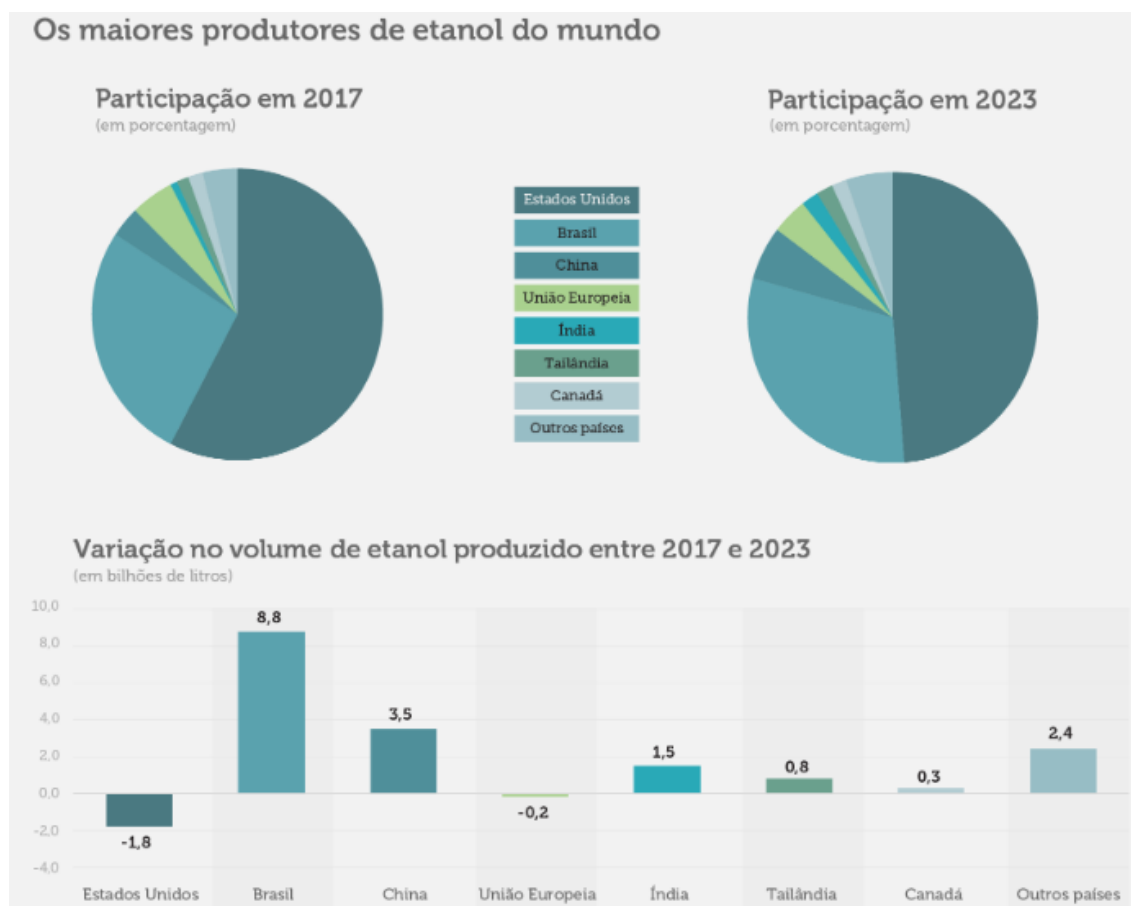
Fonte: CONAB (2019).

Nota: (1): estimativa em abril/2019

Segundo o relatório da Agência Internacional de Energia (IEA) o Brasil deve ampliar sua produção de etanol em 8,8 bilhões de litros (Figura 3.2), passando a representar 30,6% da produção mundial em 2023. Em 2017, essa participação foi de 26,6%. Dessa maneira, o Brasil chegaria em 2023 produzindo 36,5 bilhões de litros. E as principais causas para alta participação do renovável da cana-de-açúcar no mercado doméstico são a grande frota de veículos do tipo *flex-fuel*, a mistura de 27% na gasolina e o mandato de mistura no biodiesel (BOSSLE, 2018).

O Brasil, na condição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, projeta para o segmento crescente relevância para o agronegócio brasileiro. O aumento da demanda mundial por etanol, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um participante na comercialização mundial com elevada competitividade.

Figura 3.2 – Ampliação da produção de etanol no Brasil.



Fonte: NOVACANA (2018).

A produção de etanol nas destilarias brasileiras ocorre principalmente por via fermentativa, sendo conduzida principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora outros microrganismos também possam produzir etanol (HIDZIR et al., 2014). Durante o processo fermentativo, os açúcares são convertidos em etanol, energia, biomassa celular, CO₂ e outros subprodutos pela atuação da levedura. Estes açúcares podem provir de diferentes matérias-primas. No Brasil a principal matéria-prima é a cana-de-açúcar enquanto os Estados Unidos (EUA) produzem etanol a partir do milho (MANOCHIO, 2014).

No final da fermentação obtém-se um vinho com um teor alcoólico (~10°GL). O processo de destilação do vinho resulta na geração de um resíduo, comumente chamado de vinhaça ou vinhoto. Para cada litro de etanol produzido no Brasil, em média, são gerados 12 L de vinhaça. Considerando a produção de etanol na safra 2018/2019 de 33,4 bilhões de litros, isso significa uma produção de 400,8 bilhões de litros de vinhaça por ano.

A vinhaça por conter altas concentrações de matéria orgânica, potássio e sulfatos, é muito utilizada na fertirrigação de canaviais, reduzindo assim os custos com fertilizantes

(AMORIM et al., 2015). Todavia, o seu uso deve ser controlado para evitar impactos ambientais negativos, no solo, nascentes e lençóis freáticos (CGEE, 2009).

Em função do risco de contaminação ambiental, há a necessidade de reduzir o volume desse resíduo, com isso minimizar o custo com transporte, aplicação nas lavouras de cana-de-açúcar e com a gestão de possíveis passivos ambientais. O volume da vinhaça está diretamente relacionado à concentração de etanol no vinho, sendo que, quanto maior a concentração de etanol menor a produção de vinhaça (PRADO et al., 2013; ALLBURQUERQUE, 2017).

O setor sucroalcooleiro sempre está à procura de formas para melhorar o processo fermentativo, estudando diferentes tecnologias. Baseado nisso a tecnologia de fermentação com altos teores de açúcares fermentescíveis (VHG) surge como uma importante técnica a ser analisada. Os benefícios da VHG incluem considerável economia de água, maior produtividade de etanol, redução no volume de (vinhaça), considerável economia energética na etapa de destilação, menor custo de capital e menor contaminação bacteriana (PULIGUNDLA et al., 2011).

Diante disso, esta indústria continua a apresentar desafios no aperfeiçoamento do processo já que há uma crescente preocupação com os impactos ambientais.

3.2 Fermentação Alcoólica

A produção de etanol utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima pode dar-se através da fermentação do caldo da cana de forma direta ou de misturas de caldo e melaço, este proveniente da produção do açúcar. Tal mistura é frequentemente utilizada no Brasil, visto que a maioria das usinas no país produzem açúcar e etanol na mesma unidade (CGEE, 2008).

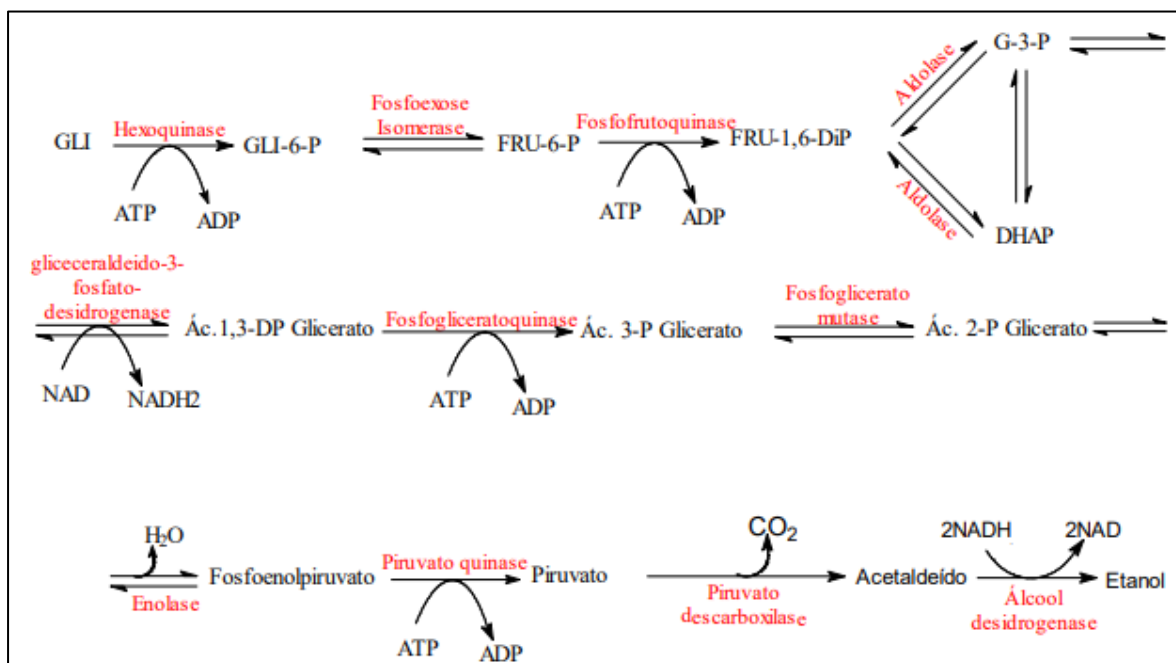
O que torna a fermentação a etapa mais importante do processo de etanol é o grande número de matérias primas naturais existentes no país que podem ser fermentadas, sendo a cana-de-açúcar a mais promissora, pela sua disponibilidade no mercado brasileiro, baixo custo e por se tratar de uma fonte rica de carbono e alta concentração de sacarose, seguida por glicose e frutose (CUNHA, 2004).

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico, no qual consiste em uma série de reações químicas catalisadas por enzimas específicas que metabolizam os açúcares, convertendo-os, principalmente, em etanol e dióxido de carbono, em condições físicas e químicas pré-determinadas. Os microorganismos mais comumente usados na fermentação

alcoólica são as leveduras, e a principal utilizada neste processo é da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua maior produtividade, adequação ao meio e robustez (LIMA et al., 2001).

Segundo Romão (2011), a principal via metabólica envolvida na produção de etanol em leveduras é a via glicolítica, uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula. Em seguida, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído, sendo finalmente reduzido a etanol e gás carbônico (CO_2), conforme a Figura 3.3. Além da produção de etanol, são produzidos em pequenas quantidades subprodutos, dentre estes, o glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores.

Figura 3.3 – Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica.



Fonte: Adaptada de ANDRADE (2007).

3.2.1 Leveduras Floculantes

Leveduras são microorganismos eucarióticos, unicelular, anaeróbicos facultativos (adaptam-se tanto em ambientes com oxigênio como na sua escassez) e formam uma das classes mais importantes dos fungos. A sua reprodução ocorre através de brotamento, onde a célula mãe dá origem a uma nova célula. Uma série de reações ordenadas ocorre no interior das leveduras, reações estas catalisadas por enzimas da própria célula e que têm como meta a obtenção de energia química através da degradação de açúcares. (MISSAVA, 2009).

Industrialmente, condições são criadas para que as leveduras possam se desenvolver e, paralelamente, produzir etanol em quantidades economicamente viável. Uma das espécies mais utilizadas na indústria de biotecnologia é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido à alta capacidade de tolerar baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, além disso, alta competitividade perante contaminação (bacteriana ou por outras leveduras) durante a fermentação e capacidade de crescer anaerobicamente. (MISSAVA, 2009).

Com objetivo de melhorar o desempenho de plantas industriais, aumentar a densidade celular no interior de fermentadores e diminuir os custos de produção, pesquisadores conseguiram selecionar linhagens de leveduras que desempenham papel diferenciado no processo de fermentação alcoólica. São as denominadas “leveduras floculantes” as quais possuem a capacidade de se agregarem espontaneamente e formar flocos como visto na Figura 3.4. Após a conversão dos açúcares presente no caldo da cana em etanol, esta levedura se agrega em forma de flocos e sedimentam no fundo do reator. Assim, para a extração do álcool não há a necessidade da etapa da centrifugação, já que a levedura floculante fica retida no interior do tanque e pode ser reutilizada sem a necessidade de tratamentos extras. (CUNHA, 2004).

Figura 3.4 – Células floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* observadas ao olho nu.



Pouco tempo atrás, acreditava-se que a floculação ocorria exclusivamente pela contaminação bacteriana nas dornas. Atualmente, vem sendo analisadas algumas linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam propriedade de flocular.

Essas linhagens possuem genes que expressam proteínas, as floculinas, que permitem o crescimento de forma floculada (ZHAO e BAI, 2009).

As leveduras floculantes têm sido tradicionalmente utilizadas pelas indústrias cervejeiras e de vinho, sendo esse processo bem conhecido e desenvolvido. Porém a sua aplicação em outras indústrias biotecnológicas como em processos de fermentação alcoólica ainda necessita de novos avanços (MA et al., 2009).

3.3 Fermentação em VHG

A partir dos avanços tecnológicos desenvolvidos na produção de etanol, o que tem despertado bastante interesse é a introdução da tecnologia *Very High Gravity* (VHG). Tecnologia que envolve a preparação e fermentação de mostos contendo elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis. Normalmente, há três classes de concentrações iniciais de açúcares empregadas em fermentações alcoólicas, tais como, concentração normal (*normal gravity*, NG) até 180 g/L, concentrações altas (*high gravity*, HG) na faixa de 180 a 240 g/L e concentração muito altas (*very high gravity*, VHG) acima de 250 g/L (DEESUTH et al., 2015; RIVERA et al., 2017).

Na fermentação de etanol, 1 mol de glicose é convertido em 2 mol de etanol e 2 mol de dióxido de carbono. Assim, um meio contendo altas concentrações de açúcares obterá maior concentração de etanol. E o emprego da tecnologia VHG é uma técnica que traz uma série de benefícios sobre as abordagens convencionais, ou seja, essa técnica possui um ganho de eficiência de até 7%, permite melhorar a produtividade atual da produção de etanol, incluindo vinhos de altos teores alcoólicos (15% em volume), redução da produção de vinhaça, redução no custo global de produção de etanol entre 5 e 7%, redução do uso de água, redução de gastos energéticos oriundo da etapa de destilação e minimização da contaminação bacteriana (CTBE, 2014).

Com altas concentrações de açúcares no mosto, tal processo pode impor condições estressantes às células de levedura, como o estresse osmótico e o estresse relacionado aos altos níveis de etanol no final da fermentação, induzindo assim a perda de viabilidade celular, taxas de fermentação reduzidas e fermentações incompletas. Nesse contexto, o principal desafio é o desenvolvimento de cepas resistentes às múltiplas tensões encontradas no processo. Além disso, determinar o efeito da temperatura, bem como as altas concentrações de substrato e etanol na cinética de crescimento celular, o que afeta claramente o desempenho do processo de fermentação (RIVERA et al., 2017).

A fermentação em VHG trata-se de um tipo de processo de melhoria destinado a aumentar a taxa de fermentação, a concentração final de etanol e consequentemente reduzir os custos do processo. A sua aplicabilidade nas indústrias se torna possível desde que sejam eliminadas as consequências negativas relacionadas às condições estressantes geradas durante o processo fermentativo com mostos de concentrações elevadas de substrato (MUSSATTO et al., 2010).

3.4 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Vários são os fatores que interferem no desempenho do processo fermentativo, sendo que neste trabalho serão discutidos tais fatores, temperatura, pH, concentração do substrato e etanol.

3.4.1 Temperatura

A temperatura é um fator muito importante na fermentação alcoólica, pois tem impacto vital nas atividades microbianas. Além disso, a produção de etanol depende da temperatura de fermentação, já que na etapa que ocorre desprendimento do CO₂, ocorre aumento da temperatura e, consequentemente, formação do álcool (MALLOUCHOS, 2003). No entanto, temperatura elevada pode ser considerada como um fator de estresse, desfavorável ao crescimento da levedura, ao aumento do teor alcoólico e favorável para a multiplicação bacteriana. Assim, é necessário predeterminar uma temperatura ideal durante a fermentação para um crescimento adequado, bem como um maior rendimento de etanol. Em geral, acredita-se que a faixa de temperatura ideal seja entre 20 a 35°C (BALLESTEROS et al., 2004; PHISALAPHONG et al., 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem uma boa atuação na faixa entre 25 a 35°C. Não obstante, o estresse térmico e os estresses causados pela exposição a alta concentração de etanol e pressão osmótica, gerados durante o processo fermentativo, afetam significativamente a produção de etanol, diminuem a taxa de crescimento das leveduras e consequentemente a eficiência do processo, devido ao aumento da morte celular. (PATRASCU et al., 2009). Em estudo com a cepa *S. cerevisiae* BY4742, segundo Lin et al. (2012) a maior taxa de crescimento celular e produtividade de etanol foram encontrados 30-45°C, enquanto que a 50°C houve uma diminuição significativa no crescimento celular e no rendimento de etanol. O que reforça a ideia da existência de uma faixa ótima de temperatura

para se trabalhar sem que a modificação no valor de temperatura dentro dessa faixa implique em grandes perdas de produtividade.

Para a fermentação VHG, deve ser investigado quantitativamente o efeito da temperatura no consumo de substrato e nas taxas de produção de etanol para determinar as condições de operação mais adequadas, já que a mesma impõe condições estressantes às células de levedura. Quando utilizam altas concentrações de açúcar no processo, é recomendado diminuir a temperatura para minimizar a morte celular, consequentemente evitar quedas na viabilidade celular, devido ao aumento da quantidade de etanol produzido e para manter níveis elevados de produção de etanol, quando a temperatura está aumentando no reator industrial (LALUCE et al., 2009; CRUZ, 2019).

Estudos feitos por Barbosa (2013) mostraram que para concentração de 30% (m/v) de sacarose a 30°C a produção de etanol atingiu níveis de 17% v/v, enquanto que a 37°C atingiu 15% v/v, evidenciando assim a influência da temperatura sobre o processo fermentativo e induzindo a queda da viabilidade celular e redução da produção de etanol. Cruz et al. (2018), avaliando, a influência conjunta das variáveis temperatura, concentração celular e de sacarose inicial na fermentação, obteve resultados satisfatórios com rendimento de 93% e teor final de etanol de 14, 4°GL à 26°C, utilizando concentração de 35 g/L de concentração celular e sacarose inicial de 240 g/L.

3.4.2 pH

Durante a fermentação o pH é um dos fatores-chave para a produção de etanol, pois tem influência direta sobre os organismos, bem como sobre seus processos celulares (KASEMETS et al., 2007; PIRSELOVA et al., 1993). Em geral, as concentrações de H^+ na fermentação do caldo podem alterar a carga total da membrana plasmática, o que afeta a permeabilidade de alguns nutrientes essenciais nas células. A faixa de pH ideal para *S. cerevisiae* utilizada na produção de etanol é 4,0-5,0 (LIN et al., 2012). No entanto, muito recentemente, foi relatado que esta levedura poderia produzir etanol, a partir de caldos, com pH 3,8 (LOUHICHI et al., 2013), embora o pH crítico para este organismo seja de 2,3 (KASEMETS et al., 2007). E estudos com diferentes matérias-primas, relatou diferentes faixa de pH ótimo, como 2,8 a 3,4 para caldo de cana (FUKUSHIMA et al., 1988) e 4,0 a 4,5 para sacarose (ISONO e HOSHINO, 2000).

Santos (2014) comparou a influência do pH do inóculo no rendimento e produtividade da fermentação, utilizando a cepa C2/00 da *Saccharomyces cerevisiae* e pH de 2,5 a 6,0.

Sendo que, os resultados obtidos em pH 4,0 e 4,5 foram superiores em relação aos obtidos em pH abaixo de 4,0, que obteve baixa conversão de sacarose, o que implica em uma alta quantidade de açúcar residual.

3.4.3 Fatores de estresse (etanol e substrato)

A presença de altas concentrações de etanol no final da fermentação é um dos principais fatores de estresse que atuam sobre a levedura. O seu acúmulo causa um efeito tóxico na levedura, que envolvem a inibição do seu crescimento, inativação enzimática, queda na viabilidade celular e inibição de vários sistemas de transporte, tais como: o de aminoácido permeases e o de hexoses (SANTOS et al., 2008; DE LA TORRE-GONZÁLEZ et al., 2016). O grau de inibição do etanol depende da linhagem de levedura utilizada, da temperatura, da composição do meio e da aeração. Estes agindo direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática, provocando modificações na membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e ação de algumas enzimas (ATALA, 2004; TONOLI, 2017).

Embora, haja restrições ao processo, elevadas concentrações de etanol são desejáveis no final da fermentação, a fim de reduzir o consumo de água e os custos de energia durante a destilação. No entanto, o teor de etanol na maioria das destilarias ainda é limitado devido à tolerância das linhagens às altas concentrações de etanol (BAI et al., 2008).

Altas concentrações de açúcares iniciais também expõem as leveduras a estresses fisiológicos. Quanto maior a concentração de substrato, maior a pressão osmótica. A pressão osmótica que é a pressão exercida pelo mosto sobre as leveduras, tem a finalidade de estabelecer o equilíbrio entre a concentração de solutos, dentro e fora das células, o que resulta em aumento da morte celular e limitação no crescimento microbiano (JHON et al., 2012). Além disso, esse fator de estresse pode agir de forma sinérgica com o etanol, aumentando o poder tóxico do mesmo, o que intensifica a diminuição do crescimento e da viabilidade celular.

No entanto, as células de leveduras têm mecanismos de resposta ao estresse para as condições industriais de fermentação e tratamento com ácido. Quando as mesmas estão submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas moleculares dos efeitos causados pelo estresse. Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana, dentre outros fatores (MELO, 2006).

A trealose e glicogênio são carboidratos de reserva para energia adicional quando as células estão famintas por açúcares (FERREIRA, 1999; BROWN, 2013). E a trealose é um composto protetor da membrana que ajuda as células a tolerar a desidratação e altas concentrações de etanol, além de outros estressantes industriais (D'MORE, 1991). O ácido succínico em combinação com o etanol tem efeito antibacteriano, enquanto o glicerol é um regulador de choques osmóticos (LIMA et al., 2001).

Em fermentações com altas concentrações de substrato no início e altos níveis de etanol no final, o fator estresse sobre a levedura, também pode ser superado pela suplementação do meio com ácidos graxos insaturados, vitaminas e proteínas e/ou utilização de linhagens de células robustas que mantenham a viabilidade celular durante os processos fermentativos (WANG et al., 2007; TONOLI, 2017).

3.4.4 Processos de Fermentação

Em suma, os processos fermentativos podem ser especificados conforme a forma com que o substrato é adicionado e o produto é retirado do biorreator. Segundo Schimdtell et al. (2001), a fermentação pode ser conduzida por processos em batelada, batelada alimentada e contínuo. Sendo que, pode haver recirculação ou não de células durante tais processos.

A utilização do reciclo de células faz com que o processo seja mais rápido e tenha menores custos. Diante disso, as células são reutilizadas após passar por uma etapa de separação (centrifuga) e tratamento químico (ácido e água) (SCHIMDELL et al, 2001).

Nas indústrias brasileiras, a fermentação alcoólica é realizada de duas maneiras: batelada alimentada com reciclo de células (processo Melle-Boinot) ou processo contínuo multiestágios (NOVACANA, 2013). Aproximadamente, 85% de todas as destilarias brasileiras utilizam o processo de fermentação em batelada alimentada, enquanto os restantes 15% executam fermentação contínua (GODOY et al., 2008).

A escolha do processo mais adequado dependerá das características do espaço físico da unidade de produção, das características da matéria prima, das propriedades cinéticas dos microrganismos e até do clima da região onde a usina fica localizada (CNPEM, 2017).

3.4.4.1 Batelada

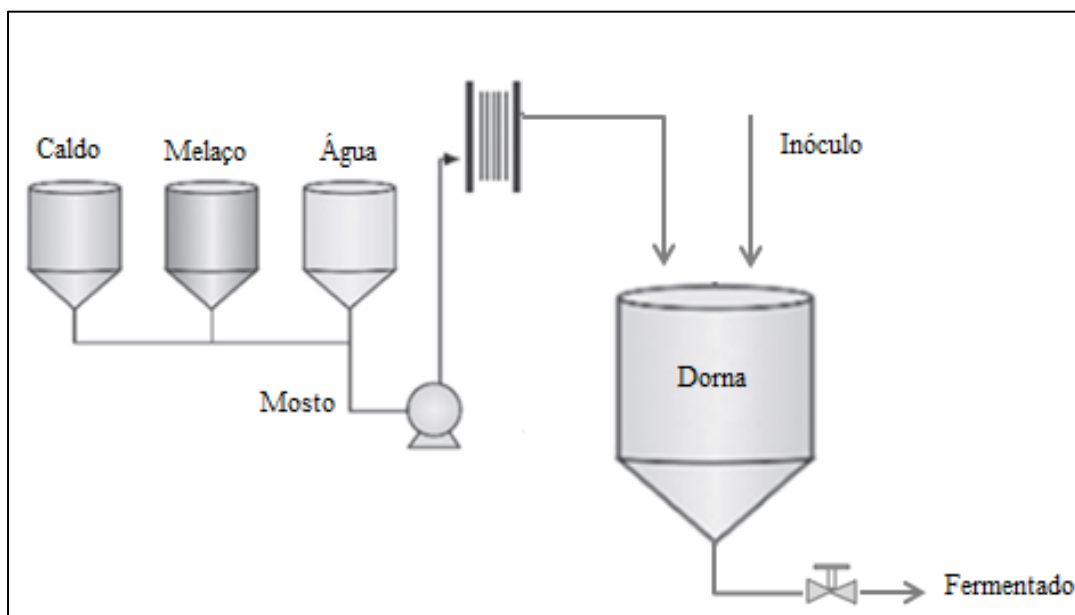
A fermentação em batelada, também conhecida como descontínua, em termos de biotecnologia industrial é um processo fermentativo caracterizado pela inoculação e

incubação de microrganismos de modo que forneça boas condições para a fermentação (Figura 3.5). Assim, de acordo com Schimdell et al. (2001) o modo de operação pode ser descrito em três partes:

- 1) O meio esterilizado contendo a solução nutriente é inoculado com o microrganismo desejado, de modo a permitir que a fermentação ocorra em boas condições;
- 2) No decorrer do processo fermentativo, nada é adicionado, exceto oxigênio, nos casos aeróbicos, antiespumante e ácido ou base para controle de pH;
- 3) Ao atingir o final da fermentação, ocorre o descarregamento da dorna e o fermentado segue para tratamentos finais. Então, a dorna deve ser esterilizada para que seja recarregada novamente com mosto e inóculo.

Uma das vantagens além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de fabricação de diferentes produtos e por permitir melhor condição de controle do processo. Em contrapartida, a fermentação em batelada, leva a baixos rendimentos e produtividade quando o substrato é adicionado de uma só vez, no início da fermentação, exerce efeitos de inibição ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO e SATO, 2001).

Figura 3.5 – Processo em batelada.



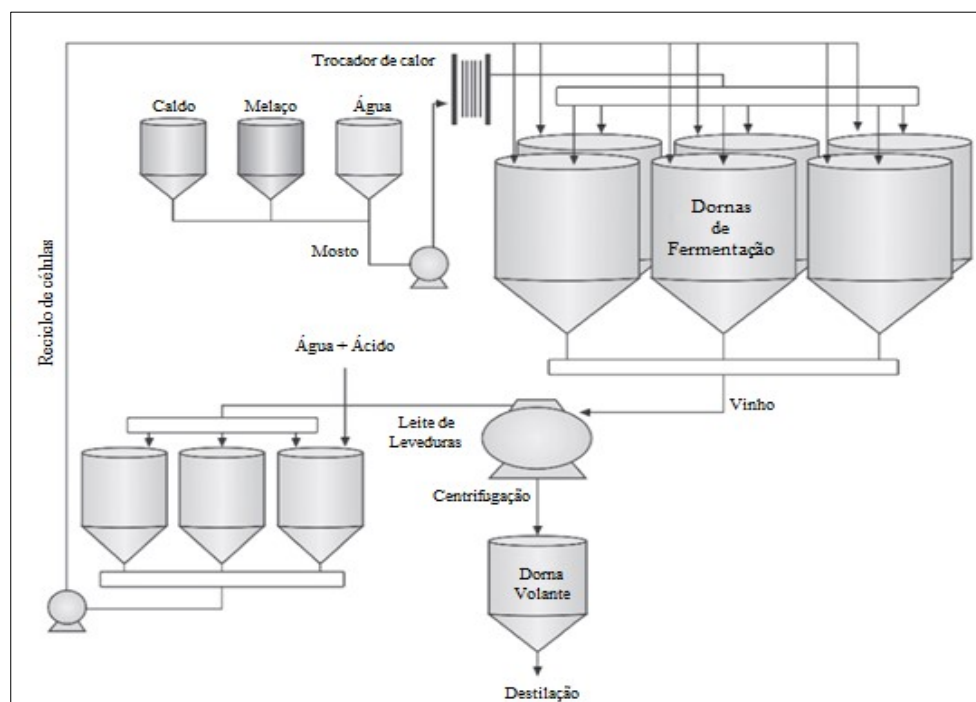
Fonte: Adaptada de Schimdell et al. (2001).

3.4.4.2 Batelada Alimentada

O processo de batelada alimentada é um dos processos mais utilizados na produção de etanol, isso é devido à facilidade de operação, que não exige muito conhecimento técnico, monitoramento do processo e maior flexibilidade nas operações. Além do mais, o produto final apresenta maior concentração alcoólica e, conseqüentemente maior rendimento. Um das vantagens deste processo é que possibilita uma vazão de alimentação constante ou variável com o tempo e a adição de mosto de forma contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de alimentação dos reatores com meio nutriente nos processos batelada alimentada é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, minimizando assim os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a sua adição em momentos propícios durante a fermentação (MCNEIL e HARVEY, 1990; AMARAL, 2009).

No Brasil, o processo de fermentação predominantemente é a batelada alimentada com reciclagem de células (Figura 3.6), sendo que 70-80% das destilarias utilizam esse modo de operação (BRETHAUER e WYMAN, 2010). Nesta configuração 90-95% da célula de levedura é reutilizada a partir da fermentação sucessiva (reciclagem intensiva). Isso permite altas densidades celulares dentro dos fermentadores, o que contribui para reduzir o tempo de fermentação para 6-11h (BASSO et al., 2008).

Figura 3.6 – Processo em batelada alimentada.



Fonte: Adaptado de LOPES et al. (2016).

3.4.4.3 Contínuo

Na Figura 3.7, representa esquematicamente uma configuração típica de um processo de fermentação contínua no Brasil, sendo de 3 a 5 dornas conectadas em série comumente denominadas de processo contínuo multiestágio. A alimentação de mosto e células ocorre simultaneamente na primeira unidade. Em seguida, o vinho, já parcialmente fermentado, segue por transbordamento para uma segunda dorna também mantida cheia, e, em seguida, para uma terceira ou quarta, em série, até que todos os açúcares tenham sido consumidos. Da última dorna, o vinho fermentado segue para a centrifugação, onde o leite de levedura é tratado, em geral, também continuamente com água e ácido em mais de um tanque em série. Em seguida, o fermento tratado segue de volta para a primeira dorna onde é alimentado junto com o mosto (ANDRIETTA, 1994).

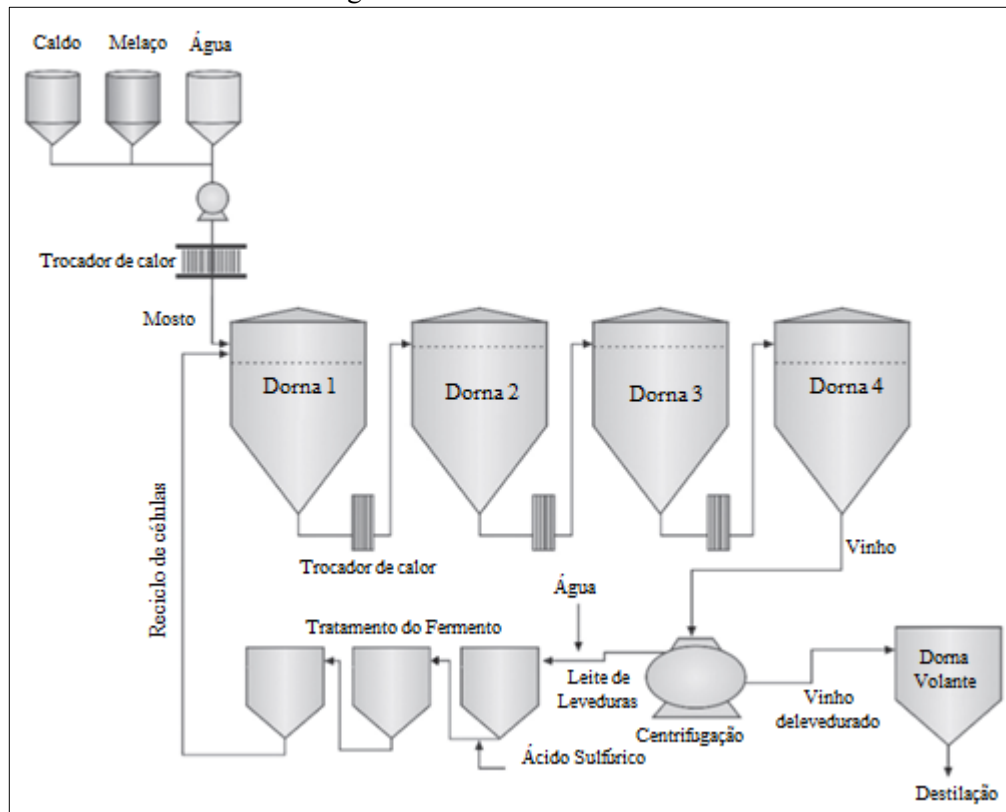
No Brasil a fermentação continua teve um tempo de prestígio, já que além dos custos de implantação, manutenção, automação e operação serem menores, o sistema propicia redução de custos com anti-espumantes. No entanto, problemas sérios de contaminações bacterianas e de queda de rendimentos são comuns, daí a opção de muitas usinas pela fermentação em batelada, onde o operador tem mais domínio do processo (CNPEM, 2017).

Segundo Tercio Marques Dalla Vecchia, CEO da Reunion Engenharia:

A fermentação contínua é uma excelente solução para algumas situações porque proporciona estabilidade de matéria-prima (vazão com poucas flutuações), qualidade de operação, ótimo controle de temperatura, além de ter duas linhas em paralelo para eventuais reduções de produção, e ainda leveduras adaptadas ao meio. No entanto, este sistema, na melhor das hipóteses, chega a um rendimento próximo da fermentação em batelada, mas nunca superior, o que se deve ao fato de sempre haver maior teor de açúcar residual no vinho.

Assim, cada uma das fermentações tem seus pontos positivos e negativos e a escolha vai depender das características de cada unidade produtora. Um aspecto relevante na comparação entre os tipos de fermentações é no volume de vinhaça produzido, pois, sem dúvida, o futuro da indústria sucroalcooleira vai depender da produção de menor volume deste resíduo e isto implica em trabalhar com alto teor alcoólico no vinho. Este fator deverá alterar o desenho das fermentações para atender as necessidades do processo sem perda da eficiência fermentativa (CNPEM, 2017).

Figura 3.7 – Processo Contínuo.

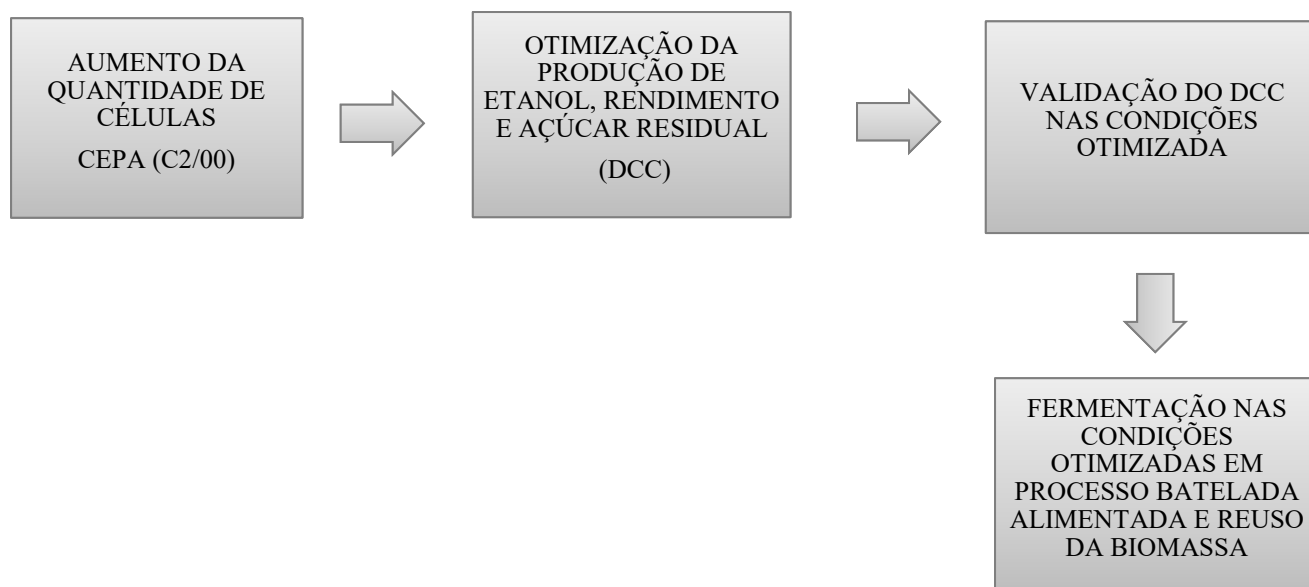


Fonte: Adaptada de LOPES et a (2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados no desenvolvimento experimental desta Dissertação, bem como a metodologia empregada para cada etapa. O fluxograma da Figura 4.1 representa as etapas realizadas neste trabalho.

Figura 4.1 – Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.



4.1 Materiais

4.1.1 Local de execução da pesquisa

A pesquisa foi realizada no laboratório de análises Núcleo de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia– FEQ/UFU.

4.1.2 Levedura Floculante

Utilizou-se a cepa C2/00 da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes, cedida pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

4.1.3 Cultivo

A cultura estoque de células de leveduras foi mantida no meio líquido contendo sacarose (100g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e extrato de levedura (6 g/L) (PACHECO, 2010). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção do açúcar, o qual foi substituído pelo açúcar cristal comercial.

A multiplicação de células foi realizada em frascos de erlenmeyer de 500 mL, com volume útil de 200 mL, com meio de cultivo contendo as mesmas concentrações descritas anteriormente. Em seguida, eram incubadas em uma mesa agitadora (*Shaker*) a 120 rpm e a temperatura ambiente por 24 horas. Após o cultivo, a fase líquida era descartada e a massa de células decantadas era transferida para um recipiente maior com um novo meio estéril de cultivo. Essa suspensão de células foi mantida sob refrigeração, a $7 \pm 1^\circ\text{C}$, até o momento das fermentações. Para o aumento do estoque de células as mesmas eram repicadas semanalmente.

4.1.4 Meio de fermentação

As fermentações VHG em frascos agitados e em reator em bancada foram realizadas utilizando a mesma composição do meio utilizado para manutenção da cultura, com exceção da concentração de sacarose utilizada, que variou para cada experimento. O pH inicial do meio foi ajustado para 4,5 com HCL 1M e/ou NaOH 1M para todos os experimentos realizados.

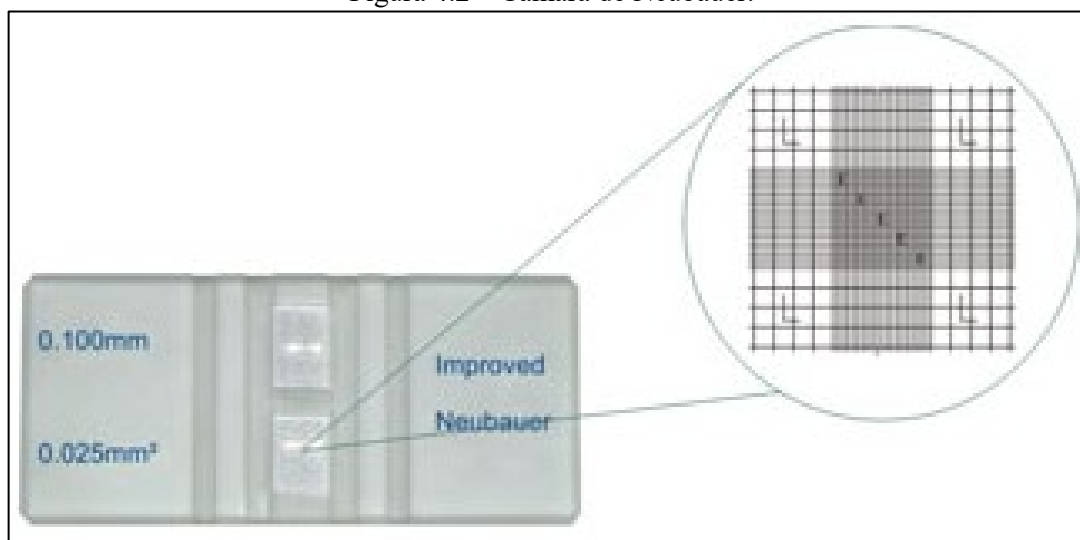
4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Viabilidade Celular

Para a quantificação de células vivas e mortas foi realizada contagem em câmara de Neubauer espelhada em microscópio (Olympus). A placa é dividida em 9 quadrantes (Figura 4.2), sendo que cada um deles contém 25 sub-quadrantes. Para contagem das leveduras, normalmente seleciona-se 1 dos 9 quadrantes. No quadrante selecionado para contagem, contar pelo menos 5 sub-quadrantes, determinar a média aritmética dos quadrantes contados. Em seguida, o valor do quadrante médio deve ser multiplicado por 25, que é o número total de sub-quadrantes contidos no quadrante de contagem. O valor obtido está em um volume de

0,1 mm³, para expressar o resultado em células por mL, deve-se multiplicar o número de células contadas pelo fator de 10⁴. Assim, para obter o resultado final, multiplicar o número de células/mL pelo fator de diluição da amostra (GUERRA, 2016).

Figura 4.2 – Câmara de Neubauer.



Fonte: Adaptada do LABOR SHOPPING (2019).

Para a contagem do número de células, utilizou-se a técnica de coloração de Azul de Metileno (JONES, 1981). Esta técnica consiste em misturar a amostra, adequadamente diluída, numa proporção de 1:1 com azul de metileno, sendo que as células viáveis permanecem não coradas enquanto as não viáveis coram de azul. A porcentagem ou número de células viáveis foi determinado transferindo-se após a homogeneização, com uma pipeta de Pasteur, uma alíquota para a câmara de Neubauer de forma a cobrir toda a superfície da leitura e depois ser visualizada no microscópio com aumento total 400X (GUERRA, 2016). Após a contagem do número de células vivas e mortas, a viabilidade foi calculada conforme a Equação 1.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número de células totais}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.2 Análises das concentrações de açúcares e álcool

As concentrações de açúcares totais (sacarose, glicose e frutose), etanol e glicerol foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência em todos os experimentos realizados (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) ilustrado na Figura 4.3.

Essa técnica cromatográfica é utilizada para separar uma mistura de compostos em análises químicas e bioquímicas com a finalidade de identificar, quantificar ou purificar os componentes individuais da mistura. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico de marca *Shimadzu* modelo *LC-20A Prominence*, coluna *Supelcogel-Ca*, na qual os açúcares, glicerol e etanol foram detectados por índice de refração (RID). A solução de arraste utilizada foi solução aquosa de H_3PO_4 (0,1%), com fluxo de bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32°C e volume de injeção de 20 μL . Os valores obtidos nos cromatogramas foram calculados com o auxílio de curvas padrão.

Figura 4.3 –HPLC utilizado nas análises das amostras durante a fermentação.



4.2.3 Cálculos das respostas relacionadas às fermentações

4.2.3.1 Rendimento

O rendimento fermentativo foi calculado pela Equação 2, com base na concentração de etanol produzido e na concentração de açúcares redutores totais iniciais (ARTi). De acordo com a relação estequiométrica da fermentação alcoólica, foi considerado que 100% de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais (ART).

$$Y_{ps} = \frac{C_{etanol}}{0,511 * C_{ARTi}} * 100\% \quad (2)$$

Em que:

Y_{ps} = rendimento de etanol formado em relação aos açúcares totais iniciais (%);

C_{etanol} = Concentração de etanol produzido durante a fermentação (g.L⁻¹);

C_{ARTi} = concentração de açúcar redutor total inicial (g.L⁻¹).

4.2.3.2 Produtividade

Com base na concentração de etanol ao final da fermentação e no tempo da fermentação, a produtividade foi calculada pela Equação 3.

$$Pr = \frac{C_{etanol}}{t} \quad (3)$$

Sendo:

Pr = produtividade de etanol (g/L);

C_{etanol} = concentração de etanol (g/L) produzido durante a fermentação;

t = tempo de fermentação (h)

4.2.4 Metodologia Experimental

4.2.4.1 Planejamento experimental

Foi realizado um Delineamento Composto Central (DCC) com três variáveis independentes, tendo-se um fatorial completo 2³, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos. O alfa de ortogonalidade utilizado neste planejamento experimental foi o de 1,35313. Todas as variáveis respostas (rendimento, produtividade, concentração de etanol e açúcar residual) do planejamento proposto foram analisadas estatisticamente com auxílio do *software* Statistica® 7.0. Objetivo deste DCC foi analisar a influência conjunta da temperatura, concentração de substrato inicial (ART) e concentração celular no reator.

As faixas escolhidas para a concentração de substrato (ART) no meio variaram de 240 a 320 g/L, a temperatura de 21 a 29°C e a concentração celular no reator de 12 a 30 % v/v. As

faixas das variáveis foram escolhidas com base nos resultados obtidos por Cruz et al. (2018) e dados da literatura. A Tabela 4.1 estão apresentados os valores atribuídos às três variáveis independentes no delineamento experimental, sendo que a variável X_1 refere-se à temperatura (°C), X_2 a concentração inicial de substrato – ART (g/L) e X_3 a concentração celular no reator (% v/v, que refere-se ao volume de decantado celular por volume de meio).

Tabela 4.1 – Matriz do delineamento composto central.

Experimentos	Valor Real (Valor codificado)		
	X_1	X_2	X_3
	Temperatura (°C)	Conc. ART (g/L)	Conc. celular (% v/v)
1	22 (-1)	250 (-1)	14 (-1)
2	22 (-1)	250 (-1)	28 (+1)
3	22 (-1)	310 (+1)	14 (-1)
4	22 (-1)	310 (+1)	28 (+1)
5	28 (+1)	250 (-1)	14 (-1)
6	28 (+1)	250 (-1)	28 (+1)
7	28 (+1)	310 (+1)	14 (-1)
8	28 (+1)	310 (+1)	28 (+1)
9	21 (- α)	280 (0)	21 (0)
10	29 (+ α)	280 (0)	21 (0)
11	25 (0)	240 (- α)	21 (0)
12	25 (0)	320 (+ α)	21 (0)
13	25 (0)	280 (0)	12 (- α)
14	25 (0)	280 (0)	30 (+ α)
15	25 (0)	280 (0)	21 (0)
16	25 (0)	280 (0)	21 (0)
17	25 (0)	280 (0)	21 (0)

No DCC, as fermentações foram realizadas com temperaturas inferiores a 30°C, já que segundo Lima et al. (2001) temperaturas mais baixas podem levar a uma maior resistência da levedura ao teor final de etanol e a uma menor geração de subprodutos do metabolismo celular, devido ao menor estresse a que as células estão submetidas.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 70 mL do meio de fermentação e o inóculo com concentração variável de células. As fermentações foram conduzidas em uma incubadora modelo 430 RBD (Nova Ética) sob agitação de 120 rpm e temperaturas variável para cada experimento, durante um período de 24 horas. Porém, para a análise do DCC, foi analisado o tempo de 12 horas para verificar o comportamento do

processo em um menor tempo e o tempo de 24h. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 1,5 horas.

Para o preparo do inoculo com concentração de células variáveis, em que o volume e concentração finais eram conhecidos, determinava-se a concentração de inóculo necessária para produzir um volume de suspensão de leveduras desejado.

As equações de codificação da temperatura (X_1), concentração inicial de substrato – ART (X_2) e concentração celular no reator (X_3) foram obtidas utilizando a Equação 4.

$$X_n = \frac{(X - X_0)}{\left[\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2} \right]} \quad (4)$$

Sendo que,

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

X = valor da variável a ser calculada;

X_0 = valor da variável no ponto central;

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

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

As Equações codificadas estão apresentadas nas Equações 5, 6 e 7 respectivamente.

$$X_1 = \frac{T - 25}{3} \quad (5)$$

$$X_2 = \frac{S_o - 280}{30} \quad (6)$$

$$X_3 = \frac{X_0 - 21}{7} \quad (7)$$

Após a realização dos experimentos relacionados na Tabela 4.1 e análises de todas as respostas envolvidas neste trabalho, foram realizados experimentos de validação dentro das faixas de maximização para rendimento, concentração de etanol, produtividade e minimização do açúcar residual com objetivo de testar a reprodutibilidade dos modelos obtidos.

4.2.4.2 Experimentos de validação

A partir das análises da superfície de resposta e da desejabilidade foi possível determinar as condições de processo em que se obtêm simultaneamente elevada concentração de etanol, rendimento, produtividade e a concentração de açúcares redutores totais reduzida. Logo, os experimentos de validação foram realizados nas condições de otimização definidas, dentro da faixa de estudo, através das análises feitas no *software* Statistica 7.0 e *Maple* 18. Os experimentos foram conduzidos em batelada conforme descrito no delineamento composto central.

4.2.4.3 Processo batelada alimentada

As fermentações foram realizadas em um fermentador modelo *New Brunswick Multigen* (Figura 4.4) de volume útil 2,0 L, com controles de agitação e de temperatura sendo operado em batelada alimentada. O volume de inóculo representava 30% do volume total utilizado. O volume total de cada fermentação foi de 1,5L, sendo 0,45L de inóculo e 1,05L de meio fermentativo. O meio fermentativo empregado neste experimento foi composto conforme descrito na seção 4.14 e a alimentação foi realizada por uma bomba peristáltica (*Masterflex*®, modelo n° 7553-76).

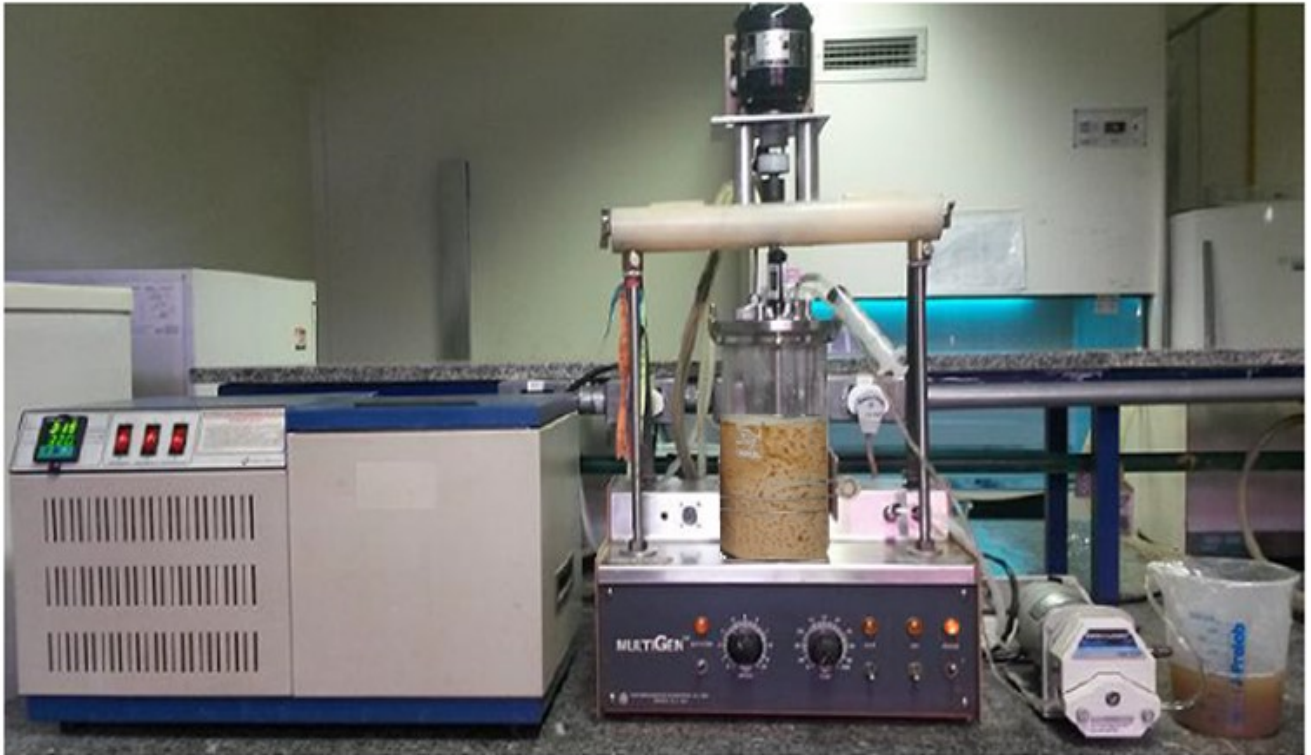
Para a 1ª fermentação, a alimentação do meio de cultura foi realizado por 2h no volume total de 1,05L com concentração total de sacarose de 407,14 g/L. O processo fermentativo começou com apenas células decantadas no fundo do reator. O experimento foi conduzido a 24°C, com pH inicial ajustado em 4,5, concentração inicial de ART 300 g/L e concentração celular inicial de 30%v/v no reator, durante 24 horas. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 1 hora. Ao final da fermentação, o fermento decantado era transferido para um novo meio estéril com as mesmas concentrações de meio de cultivo sem nenhum tratamento.

Para avaliar o desempenho da levedura com relação à sua reutilização no processo, na 2ª fermentação o ensaio experimental foi realizado conforme descrito na 1ª fermentação. Ao final da fermentação, o fermento decantado era transferido para um novo meio estéril com as mesmas concentrações de meio de cultivo sem nenhum tratamento.

Com intuito de melhorar a operação do processo batelada alimentada, o experimento foi conduzido a 24°C, com pH inicial ajustado em 4,5, concentração inicial de ART de 300 g/L e uma concentração celular inicial de 21%v/v no reator, durante 24 horas. Alimentação do

meio de cultura foi realizado por 4h no volume total de 1,05L com concentração total de sacarose de 407,14 g/L. O processo fermentativo iniciou-se com um inóculo de 0,45L, sendo 0,315L de células decantadas com 0,135L de meio sintético sem substrato. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo de 1 hora.

Figura 4.4 – Fermentador *New Brunswick* em batelada alimentada



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

5.1 Delineamento composto central

No delineamento composto central (DCC) estudou-se como o rendimento, a concentração de etanol, a produtividade e a quantidade de açúcares residuais são afetados simultaneamente pela temperatura, concentração celular no reator e concentração inicial de substrato. Estas três variáveis independentes que afetam o desempenho da fermentação alcoólica foram avaliadas nas seguintes faixas: temperatura – X_1 (21-29°C), concentração inicial de ART- X_2 (240 a 320 g/L), concentração celular no reator – X_3 (12 -30 %v/v). Os experimentos foram realizados por 24 horas. As duas otimizações utilizando o DCC foram para os tempos de 12 e 24h do mesmo experimento, ou seja, na metade e no final do experimento.

5.1.1 DCC para 12 horas de fermentação

Os valores codificados e nominais das variáveis de estudo e as condições dos ensaios com as respostas rendimento (Y_1), concentração de etanol (Y_2), produtividade (Y_3) e concentração de açúcar residual (Y_4), estão apresentados na Tabela 5.1.

Conforme as condições utilizadas no processo de fermentação, o rendimento variou entre 54,71% (experimento 9) e 82,58% (experimento 6), a concentração de etanol entre 79,31 g/L (experimento 9) e 121,7 g/L (experimento 10), a produtividade entre 6,6 g_{etanol}/L.h (experimento 9) e 10,1 g_{etanol}/L.h (experimento 10) e a concentração de açúcar residual entre 0,434 g/L (experimento 2) e 84,42 g/L (experimento 3). Além disso, verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma variação pequena para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo.

Para analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta apresentada neste delineamento composto central, considerou-se um nível de significância de 90%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,1$. Dessa forma, determinaram-

se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa Statistica® 7.0.

Tabela 5.1 – Valores codificados e nominais e suas respostas em 12 horas de fermentação.

Experimentos	Valor nominal (valor codificado)			Y ₁ (%)	Y ₂ (g/L)	Y ₃ (g _{etanol} /L.h)	Y ₄ (g/L)
	X ₁ (°C)	X ₂ (g/L)	X ₃ (% v/v)				
1	22 (-1)	250 (-1)	14 (-1)	72,91	96,82	8,10	24,52
2	22 (-1)	250 (-1)	28 (+1)	81,45	105,88	8,82	0,434
3	22 (-1)	310 (+1)	14 (-1)	51,38	80,89	6,70	84,42
4	22 (-1)	310 (+1)	28 (+1)	62,39	100,58	8,4	70,33
5	28 (+1)	250 (-1)	14 (-1)	76,13	97,14	8,10	19,11
6	28 (+1)	250 (-1)	28 (+1)	82,58	114,67	9,6	2,68
7	28 (+1)	310 (+1)	14 (-1)	64,37	102,08	8,5	61,16
8	28 (+1)	310 (+1)	28 (+1)	70,42	114,74	9,6	47,02
9	21 (-α)	280 (0)	21 (0)	54,71	79,31	6,6	82,78
10	29 (+α)	280 (0)	21 (0)	81,60	121,7	10,1	2,82
11	25 (0)	240 (-α)	21 (0)	81,07	104,67	8,7	0,88
12	25 (0)	320 (+α)	21 (0)	58,89	103,7	8,6	82,02
13	25 (0)	280 (0)	12 (-α)	65,45	95,12	7,9	65,83
14	25 (0)	280 (0)	30 (+α)	75,18	110,77	9,2	21,26
15	25 (0)	280 (0)	21 (0)	77,63	112,72	9,4	30,62
16	25 (0)	280 (0)	21 (0)	78,42	111,26	9,27	28,58
17	25 (0)	280 (0)	21 (0)	77,44	110,68	9,22	30,23

5.1.1.1 Rendimento (Y₁)

A partir dos resultados obtidos foram calculados os coeficientes de regressão das variáveis e interações, bem como os valores dos níveis de significância e estão apresentados na Tabela 5.2. Observa-se que os termos lineares e quadráticos das variáveis e interações temperatura e substrato (X₁X₂), temperatura e concentração celular (X₁X₃) foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 10% (p<0,1).

O parâmetro não significativo que pode ser desprezado para o nível de significância adotado foi a interação entre as variáveis substrato e concentração celular (X₂X₃), em que esta interação não exerceu influência significativa sobre o rendimento. A Equação 8 a seguir descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, no modelo reduzido que contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$Y_1(\%) = 75,77 + 5,29X_1 - 2,95X_1^2 - 8,14X_2 - 1,92X_2^2 + 3,94X_3 - 1,76X_3^2 + 2,08X_1X_2 - 0,88X_1X_3 \quad (8)$$

O coeficiente de correlação (R^2) obtido de 0,89 indica que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 89% da variabilidade dos dados.

Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 8, verifica-se que o sinal negativo do coeficiente X_2 indica que maiores concentrações de substrato no mosto contribuem para uma redução na resposta rendimento. Já o aumento dos valores na temperatura e na concentração celular contribui de forma positiva dentro da região experimental trabalhada para a resposta em questão. Esta análise está em concordância com os experimentos 6 e 1 na Tabela 5.1, os quais mantiveram a concentração de ART inicial constante e no experimento 6 para $X_1=28^\circ\text{C}$ e $X_3=28\%\text{v/v}$ um maior rendimento enquanto para experimento 1 ($X_1=22^\circ\text{C}$ e $X_3=14\%\text{v/v}$) um menor rendimento.

Guidini (2013) no estudo da influência dos fatores da concentração inicial de substrato, concentração celular no inóculo e de tempo de enchimento do reator batelada alimentada, após análises constatou uma diminuição no rendimento da fermentação alcoólica com um aumento na concentração de sacarose. E um aumento no rendimento, com um aumento na concentração do inóculo, assim como prevê a Equação 8 do modelo rendimento no presente estudo.

Tabela 5.2 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 em 12h.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	p
Termo independente	75,77373	0,000012
X_1 (L)	5,29817	0,000832
X_1 (Q)	-2,94854	0,004784
X_2 (L)	-8,14183	0,000352
X_2 (Q)	-1,92198	0,011152
X_3 (L)	3,94123	0,001534
X_3 (Q)	-1,75585	0,014488
X_1X_2	2,08375	0,007686
X_1X_3	-0,88125	0,040831
X_2X_3	0,25875	0,294402
$R^2=0,89$		

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões de interesse. A seguir serão apresentadas nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta rendimento em função da

temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.1 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o rendimento (%) em função da concentração celular e temperatura.

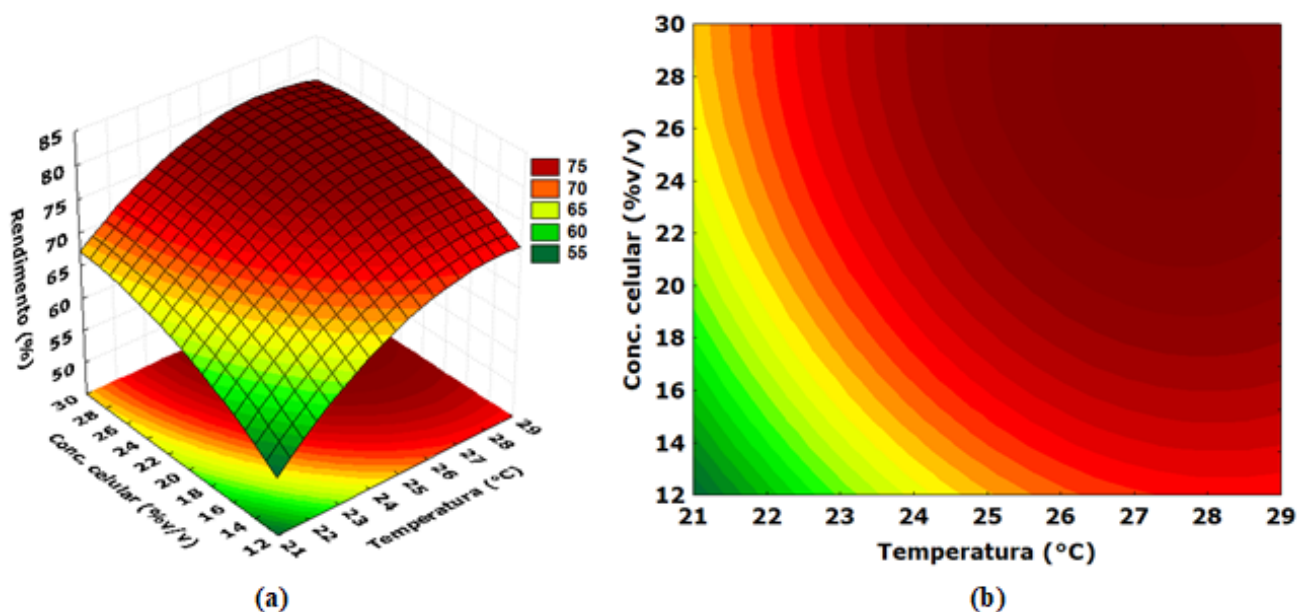


Figura 5.2 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o rendimento (%) em função da concentração substrato e temperatura.

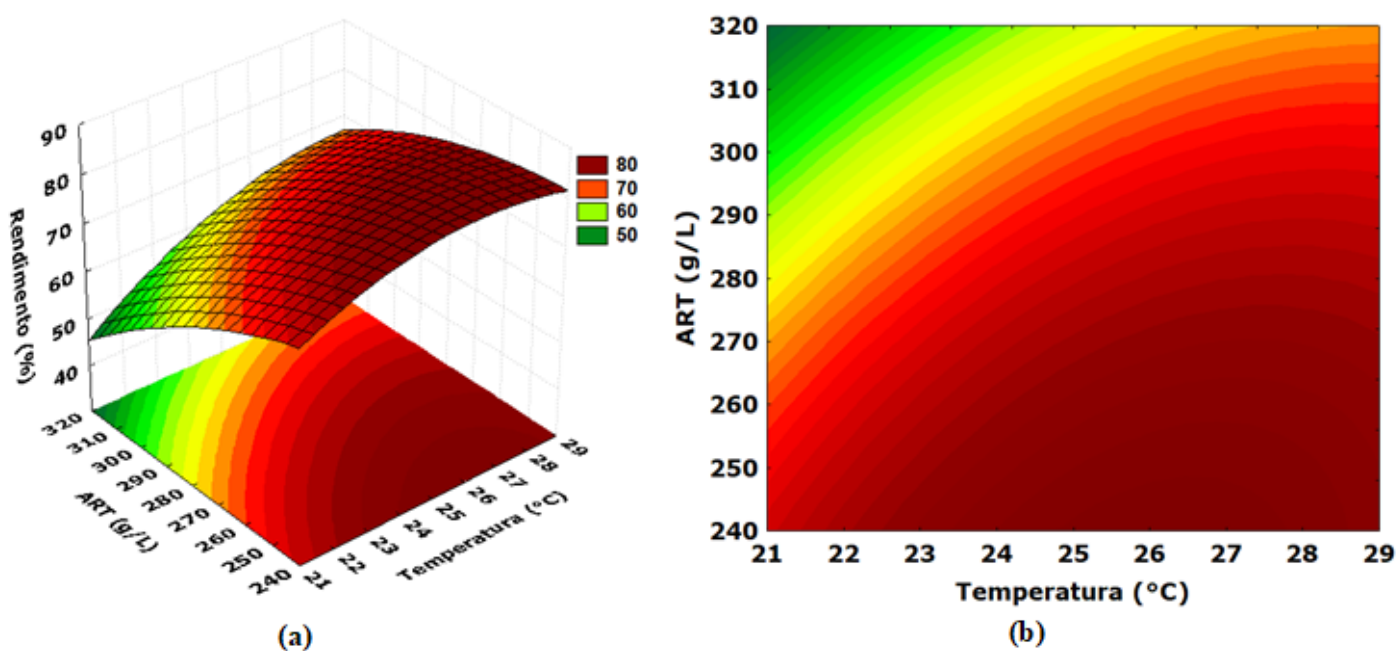
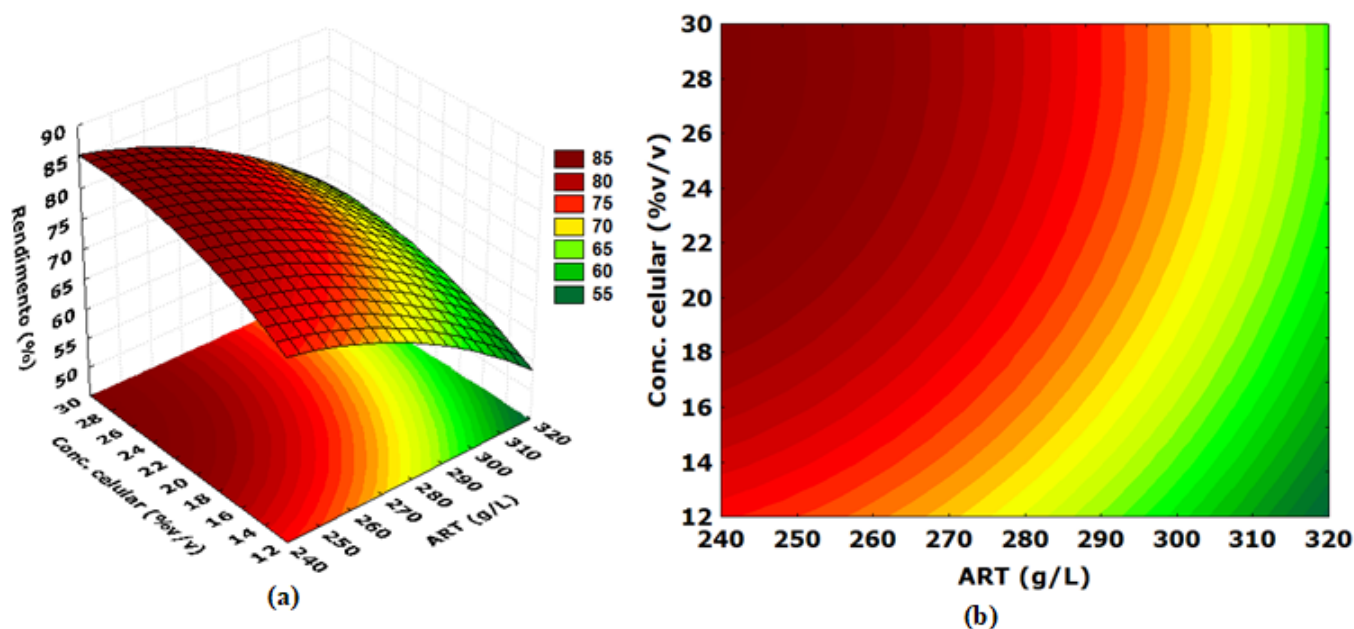


Figura 5.3 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o rendimento (%) em função da concentração substrato e concentração celular.



Analisando as curvas de contorno (Figura 5.1-b e Figura 5.2-b) definiu-se a faixa de temperatura que maximiza o rendimento.

A curva de contorno que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração celular (Figura 5.1-b) indica uma faixa de temperatura aproximada de 24 a 29°C para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura e a concentração de ART no mosto (Figura 5.2-b) indica uma faixa de 23 a 29°C. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que para a maximização da resposta rendimento, dentro da região experimental trabalhada, a temperatura deve estar entre 24 e 29°C.

Da mesma forma que para a temperatura, a partir das curvas de contorno (Figura 5.1-b e Figura 5.3-b) definiu-se a faixa de concentração celular que maximiza o rendimento na região experimental trabalhada. A faixa da concentração celular correspondente ao máximo rendimento engloba entre 21 a 30% v/v.

Para a definição da concentração de ART no mosto foi realizada a análise das curvas de contorno (Figura 5.2-b e Figura 5.3-b). De acordo com esta análise, visando um maior rendimento é interessante que a concentração de ART esteja em até 270 g/L.

5.1.1.2 Concentração de etanol (Y_2)

A partir dos dados obtidos na Tabela 5.1, analisou-se estatisticamente o comportamento da resposta concentração de etanol. Dessa maneira, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos, conforme a Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Coeficientes de regressão múltipla para a resposta Y_2 em 12h.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	p
Termo independente	109,8502	0,000024
X_1 (L)	8,7387	0,001250
X_1 (Q)	-4,1493	0,009808
X_2 (L)	-1,5156	0,039197
X_2 (Q)	-2,0793	0,037428
X_3 (L)	6,9928	0,001993
X_3 (Q)	-2,8965	0,021545
X_1X_2	3,2800	0,012596
X_1X_3	0,1800	0,675995
X_2X_3	0,7200	0,192302
$R^2 = 0,84$		

Para o nível de significância adotado, com exceção das interações da temperatura com a concentração celular (X_1X_3) e da concentração de substrato e concentração celular (X_2X_3), todos os parâmetros do modelo foram altamente significativos. A Equação 9 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a concentração de etanol.

$$Y_2(\text{g/L}) = 109,85 + 8,74X_1 - 4,15X_1^2 - 1,51X_2 - 2,08X_2^2 + 6,99X_3 - 2,90X_3^2 + 3,28X_1X_2 \quad (9)$$

Após o ajuste o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,83, indicando que 83% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na equação 9, pode-se observar que o sinal negativo do coeficiente X_2 indica que uma maior concentração de substrato no mosto contribui para uma redução na concentração de etanol. Enquanto que os sinais positivos dos coeficientes X_1 e X_3 contribuem de forma positiva para concentração de etanol, ou seja, quando a fermentação é realizada em valores mais altos de temperatura e concentração de células, a concentração de etanol aumenta. Este resultado é exemplificado comparando os experimentos 3 e 8 listados na Tabela 5.1, na qual verifica-se que a $X_1 = 22^\circ\text{C}$ e $X_3 = 14\%\text{v/v}$ uma menor concentração de

etanol (80,89 g/L) enquanto a $X_1=28^\circ\text{C}$ e $X_3=28\%\text{v/v}$ uma maior concentração de etanol (114,74 g/L), respectivamente.

Em relação à variável X_3 (Concentração celular), ao relacionar os experimentos 7 e 8, em que, a concentração de substrato no reator corresponde a 310 g/L e a temperatura a 28°C , diferindo somente na concentração celular de células no reator para os respectivos experimentos, verificou-se que ao aumentar a concentração de células no reator de 14 para 28%v/v obteve-se maior concentração de etanol (114,74g/L), comprovando assim a influência da alta concentração celular na produção de etanol utilizando a tecnologia VHG. No entanto, é claro que há um limite para esse aumento, sendo determinado pelo custo/benefício e operação.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões de interesse. Por ser um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Sendo assim, segue abaixo as Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 que ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta concentração de etanol em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.4 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de etanol (g/L) em função da concentração celular e temperatura.

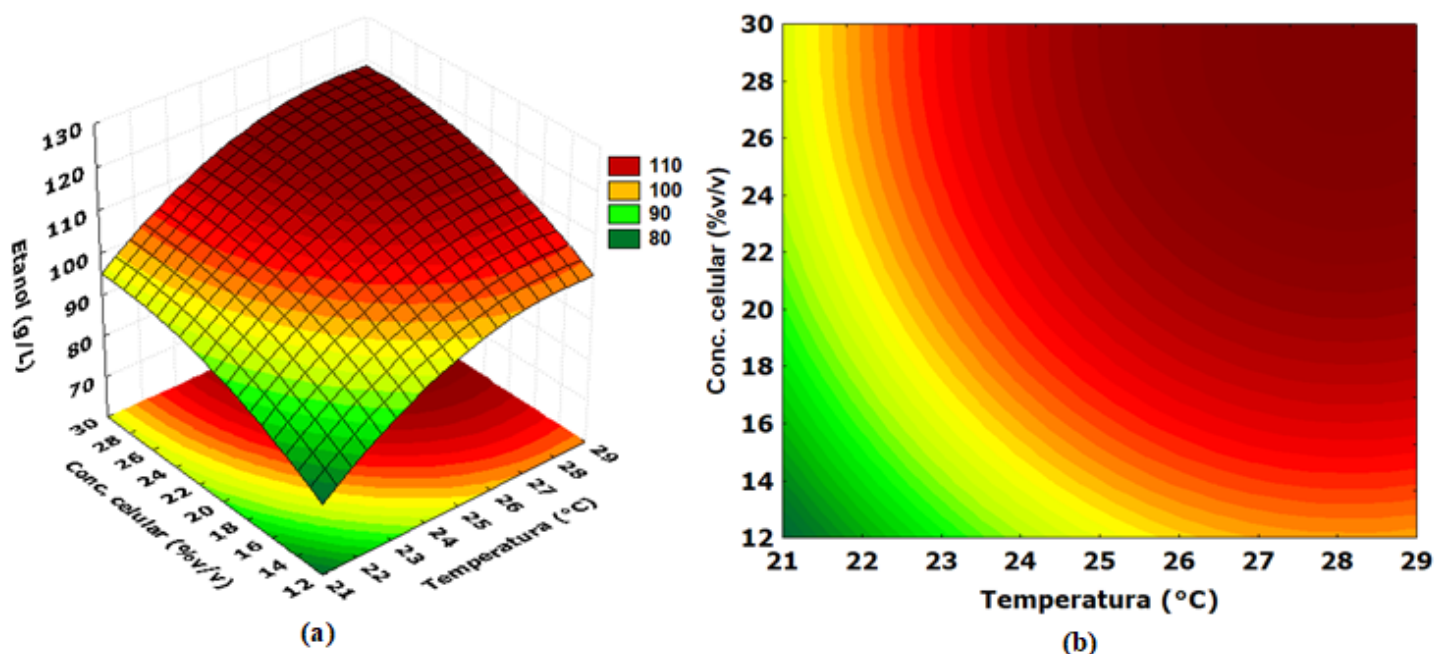


Figura 5.5 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de etanol (g/L) em função da concentração substrato e temperatura.

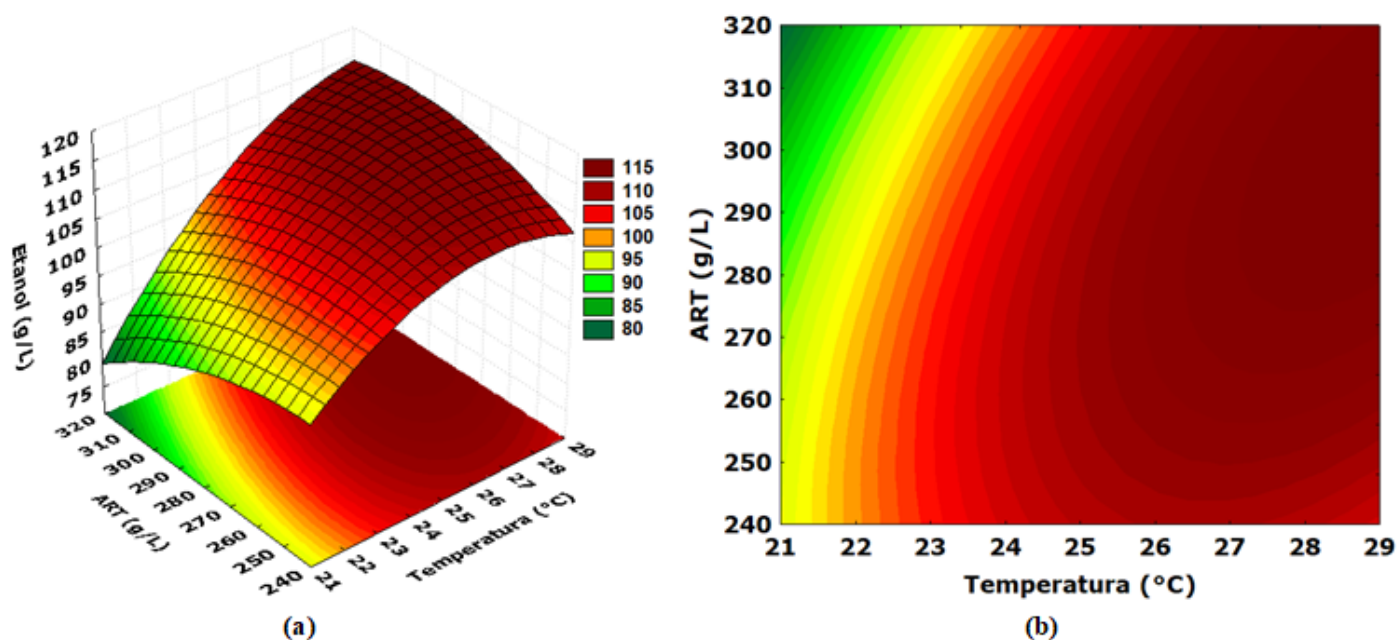
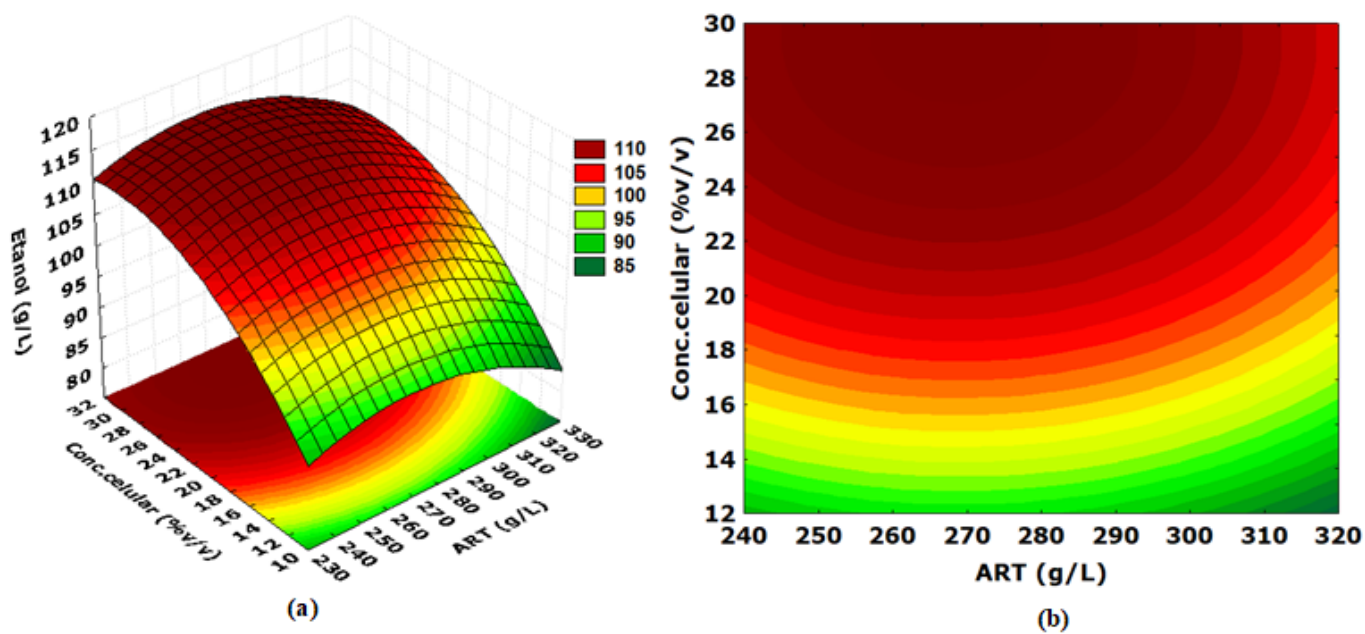


Figura 5.6 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para concentração de etanol (g/L) em função da concentração substrato e concentração celular.



Analisando as curva de contorno (Figura 5.4-b e 5.5-b) definiu-se a faixa da temperatura que maximiza a concentração de etanol no final do ciclo de 12 horas de fermentação.

A curva de contorno que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração celular indica uma faixa de temperatura aproximada de 25 a 29°C. Já o efeito combinado da temperatura e a concentração de ART (Figura 5.5-b) indica uma faixa entre 24 a 29°C. Assim, buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para a maximização da concentração de etanol na região experimental adotada, a temperatura deve estar entre 25 e 29°C.

Nas Figuras (5.4-b e 5.6-b) definiu-se a faixa de concentração celular que maximiza a concentração de etanol. Ambos os efeitos (temperatura em sinergismo com a concentração celular e concentração de ART em sinergismo com a concentração celular) englobam uma faixa entre 20 e 30%v/v.

Da mesma forma que para temperatura e concentração celular, a partir da curva de contorno (Figura 5.5-b) a faixa da concentração de ART que maximiza a resposta em questão deve estar entre 260 e 320 g/L. Já analisando a Figura 5.6-b a concentração de substrato deve estar entre 240 a 310 g/L. Após se fazer a combinação de ambos os efeitos, pode-se afirmar que para a maximização da resposta concentração de etanol a concentração de ART deve estar entre 260 e 310 g/L.

O experimento 10 da Tabela 5.1 foi o que obteve maior concentração de etanol, em que a concentração de substrato foi de 280 g/L, e a concentração celular de 21% v/v, sendo estes, valores intermediários das faixas obtidas para concentração de substrato e de células pela análise conjunta dos efeitos combinados.

5.1.1.3 Produtividade (Y_3)

Na Tabela 5.4 estão apresentados os coeficientes de regressão das variáveis, interações e os valores dos níveis de significância para cada um deles. Pode-se perceber que apenas as interações X_1X_3 e X_2X_3 não foram significativas ao nível de significância de 10% ($p < 0,1$).

A Equação 10 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta produtividade.

$$Y_3(g/L.h) = 9,14 + 0,73X_1 - 0,33X_1^2 - 0,13X_2 - 0,17X_2^2 + 0,59X_3 - 0,23X_3^2 + 0,28X_1X_2 \quad (10)$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,83, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da produtividade, mostrando que 83% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

Pode-se notar pela Equação 10, que as variáveis X_1 e X_3 exercem maiores efeitos sobre a produtividade, já que quanto maior a temperatura e maior a concentração celular no reator a taxa inicial de fermentação tende a ser maior, logo a produtividade é maior. A Tabela 5.1 confirma a interpretação dada ao modelo, deixando evidente que maiores temperaturas e maiores concentrações celulares produzem maiores produtividade, segundo pode-se verificar para o experimento 6 a $X_1=28^\circ\text{C}$ e $X_3=28\%\text{v/v}$ tem-se uma maior produtividade de 9,6 g/L.h enquanto que no experimento 1 a $X_1=22^\circ\text{C}$ e $X_3=14\%\text{v/v}$ uma menor produtividade de 8,10 g/L.h.

Cruz (2015) no estudo da influência das variáveis: temperatura, concentração celular no inóculo e concentração de açúcar redutor total no processo de fermentação em batelada alimentada, que através do modelo gerado para a resposta produtividade observou-se que um aumento da temperatura ou da concentração celular no inóculo contribui para um aumento na produtividade, sendo que tal resultado se mostra concordante com o presente estudo.

Tabela 5.4 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_3 em 12h.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	p
Termo independente	9,136244	0,000027
X_1 (L)	0,730962	0,001395
X_1 (Q)	-0,337955	0,011523
X_2 (L)	-0,134423	0,038947
X_2 (Q)	-0,169205	0,043728
X_3 (L)	0,591841	0,002173
X_3 (Q)	-0,234001	0,025631
X_1X_2	0,277500	0,013726
X_1X_3	0,022500	0,564119
X_2X_3	0,072500	0,158034
$R^2=0,84$		

Por ser um planejamento que visa otimizar três variáveis de processo, elas serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Assim, as Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta produtividade em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.7 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produtividade ($g_{\text{etanol}}/L.h$) em função da concentração celular e temperatura.

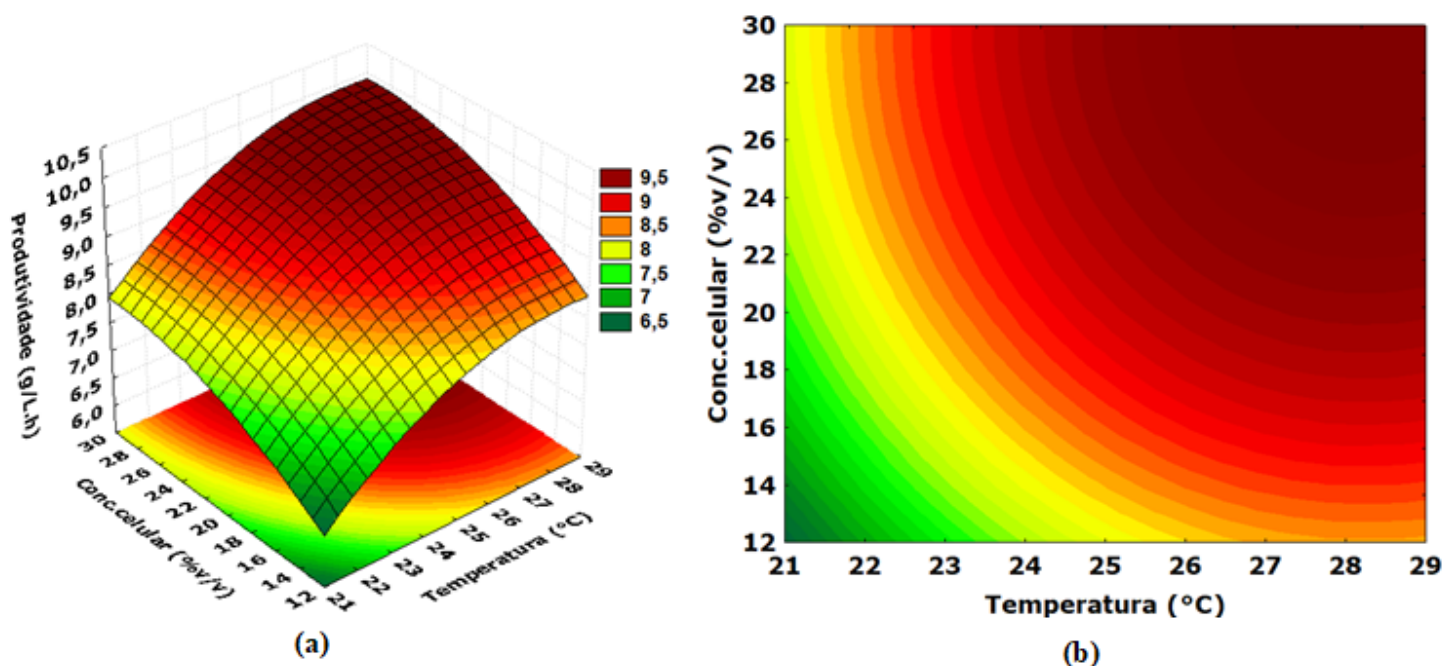


Figura 5.8 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produtividade ($g_{\text{etanol}}/L.h$) em função da concentração substrato e temperatura.

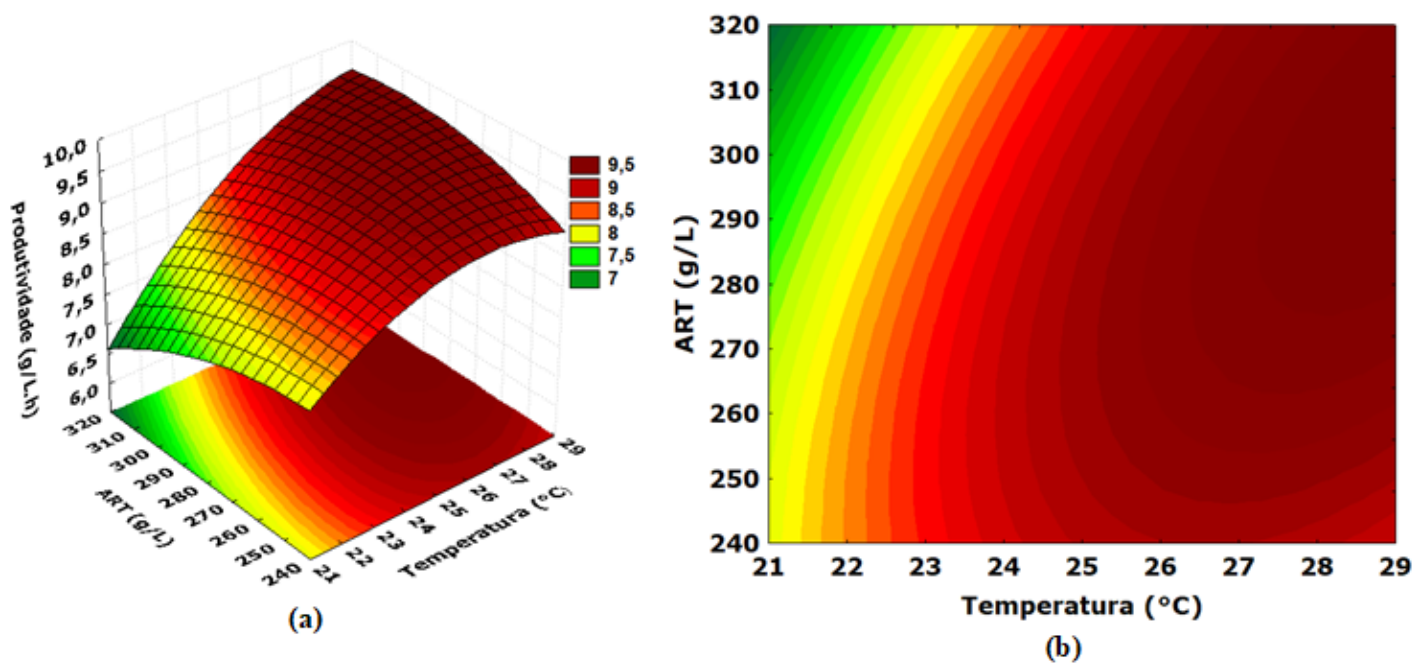
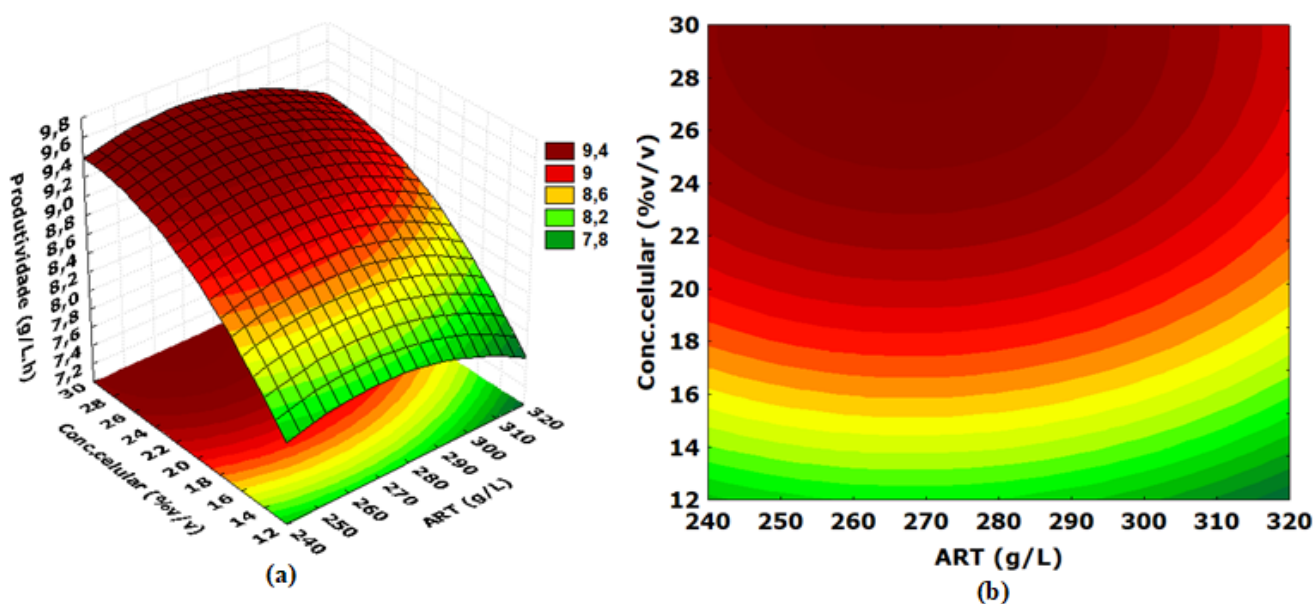


Figura 5.9 – Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produtividade ($g_{\text{etanol}}/L.h$) em função da concentração substrato e concentração celular.



Analisando as curvas de contorno definiram-se as faixas de temperatura, concentração celular e concentração de substrato que maximiza a produtividade.

As curvas de contorno (Figuras 5.7-b e 5.8-b) indica uma faixa de temperatura para ambos os efeitos combinados de 25 a 29°C para a maximização da resposta em questão. Da mesma forma que para a temperatura, a partir das curvas de contorno (Figuras 5.7-b e 5.9-b) definiu-se a faixa de concentração celular para ambos os efeitos combinados de 20 a 30%v/v que maximiza a produtividade na região experimental trabalhada.

Para determinar a concentração de ART analisou-se a curva de contorno (Figura 5.8-b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração de ART indica uma faixa que engloba valores entre 260 e 320 g/L. O efeito combinado da concentração de ART e da concentração celular (Figura 5.9-b) indica uma faixa de 240 até 310 g/L para o parâmetro em questão. Após se fazer a combinação dos efeitos em sinergia, pode-se afirmar que para maximização da produtividade na região experimental adotada no planejamento, a concentração deve estar entre 260 e 310 g/L.

Neste contexto, o presente trabalho está focado na alta produção de etanol usando meios com alto teor de açúcar, o que leva a fermentações prolongadas e consequentemente numa diminuição na produtividade do etanol. No entanto, uma maneira de contornar isso, é a utilização de altas concentrações celular, o qual fica claro a influência da variável X_3 como evidenciado na Equação 9 e na Tabela 5.1, sendo que os maiores valores de produtividade

obtidos neste DCC foram os que utilizaram maiores concentrações de células, 21; 28 e 30%v/v, nos experimentos 10, 8 e 14.

5.1.1.4 Açúcar residual (Y_4)

Refere-se à concentração de açúcar residual no meio após 12 horas de fermentação. Ao contrário das respostas rendimento e produtividade, é de interesse para as indústrias alcooleiras a minimização da resposta em questão, já que a presença do mesmo no final da fermentação indica prejuízos, por não haver a conversão desse açúcar em álcool.

Na Tabela 5.5, estão apresentados os coeficientes da regressão das variáveis e interações, incluindo os níveis de significância para cada um deles. Para a resposta em estudo, verificou-se que a interação X_1X_3 não se mostrou significativa.

Tabela 5.5 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_4 em 12h.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	p
Termo independente	33,8353	0,000265
X_1 (L)	-13,5294	0,000553
X_1 (Q)	2,4258	0,029502
X_2 (L)	28,0708	0,000129
X_2 (Q)	1,6685	0,059474
X_3 (L)	-11,1487	0,000832
X_3 (Q)	2,8481	0,023539
X_1X_2	-5,4246	0,004937
X_1X_3	0,9506	0,130892
X_2X_3	1,5354	0,056840
$R^2=0,88$		

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 11.

$$Y_4(\text{g/L}) = 33,84 - 13,53X_1 + 2,43X_1^2 + 28,07X_2 + 1,67X_2^2 - 11,15X_3 + 2,85X_3^2 - 5,43X_1X_2 + 1,54X_2X_3 \quad (11)$$

O coeficiente de correlação (R^2) de 0,88 indica que os resultados são explicados pela equação empírica proposta com 88% da variabilidade dos dados. Analisando a Equação 11, como era de se esperar a variável que mais influenciou o aumento da concentração de açúcar residual foi a concentração substrato, uma vez que maiores concentrações de açúcares redutores na fermentação têm maiores concentrações de açúcares residuais. Enquanto as

variáveis isoladas X_1 e X_3 influenciaram de forma positiva, ou seja, o aumento da temperatura e da concentração celular diminui o açúcar residual no final da fermentação.

A Tabela 5.1 confirma a interpretação dada ao modelo, deixando evidente nos experimentos 1 e 6 em que para maiores valores de temperatura e concentração celular levam a uma menor concentração de açúcar residual no final do processo fermentativo.

Guidini (2013), Santos (2014) e Cruz (2019), na análise da influência conjunta da temperatura, concentrações de substrato e célula, analisando os coeficientes da equação modelo para a resposta concentração de substrato verificou-se que a variável que mais influenciou o aumento do açúcar residual foi a concentração de substrato, conforme encontrado pelo presente trabalho na Equação 11.

Foi possível então, construir as superfícies de resposta e curvas de contorno (as Figuras 5.10, 5.11 e 5.12) e definir a região de interesse para a resposta açúcar residual em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.10 - Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração celular e temperatura.

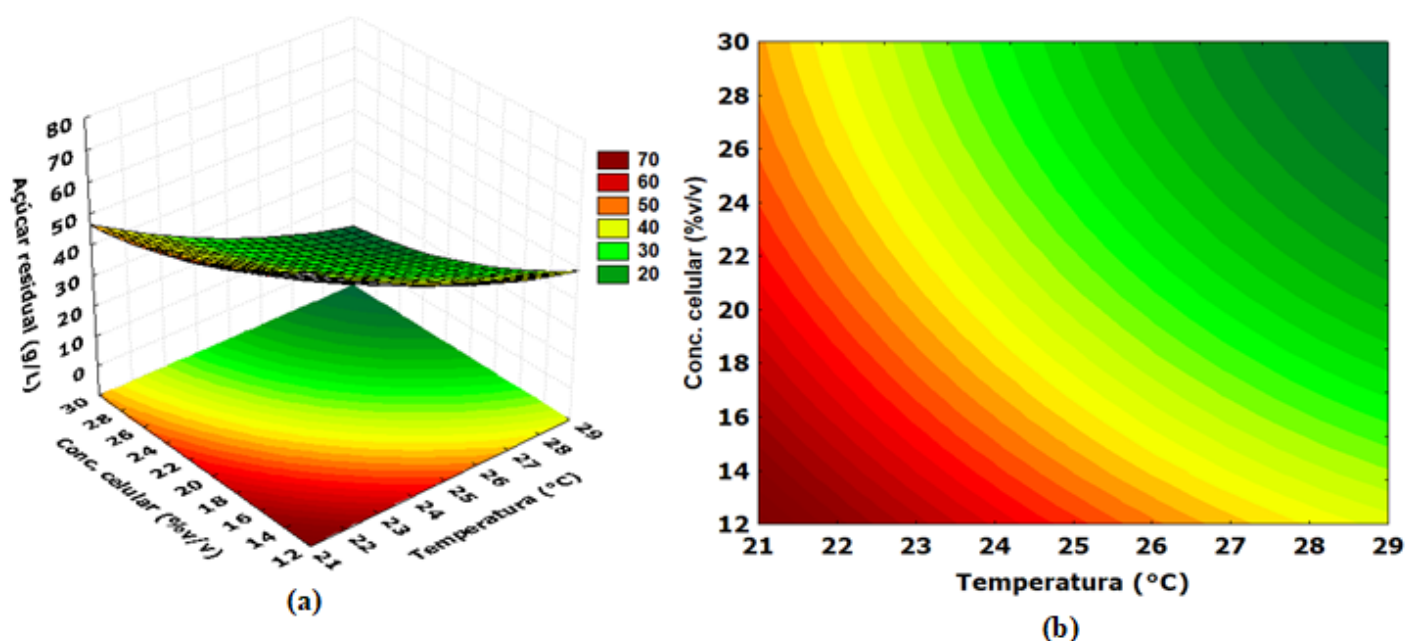


Figura 5.11- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração substrato e temperatura

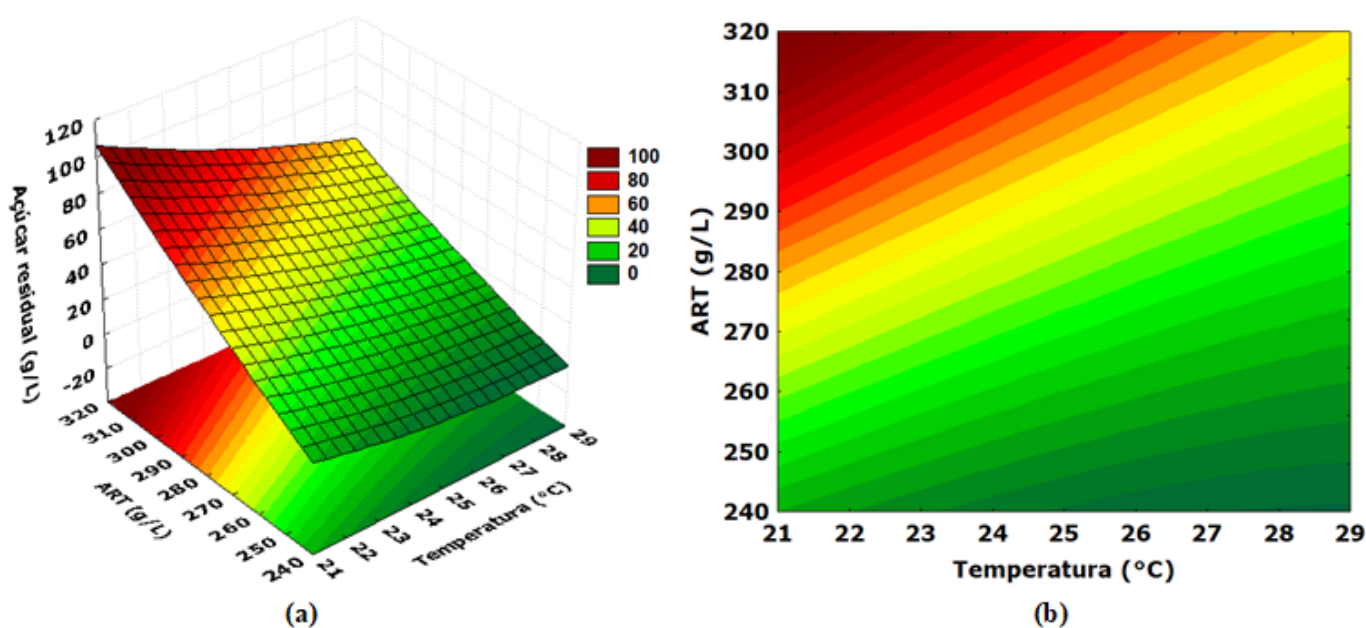
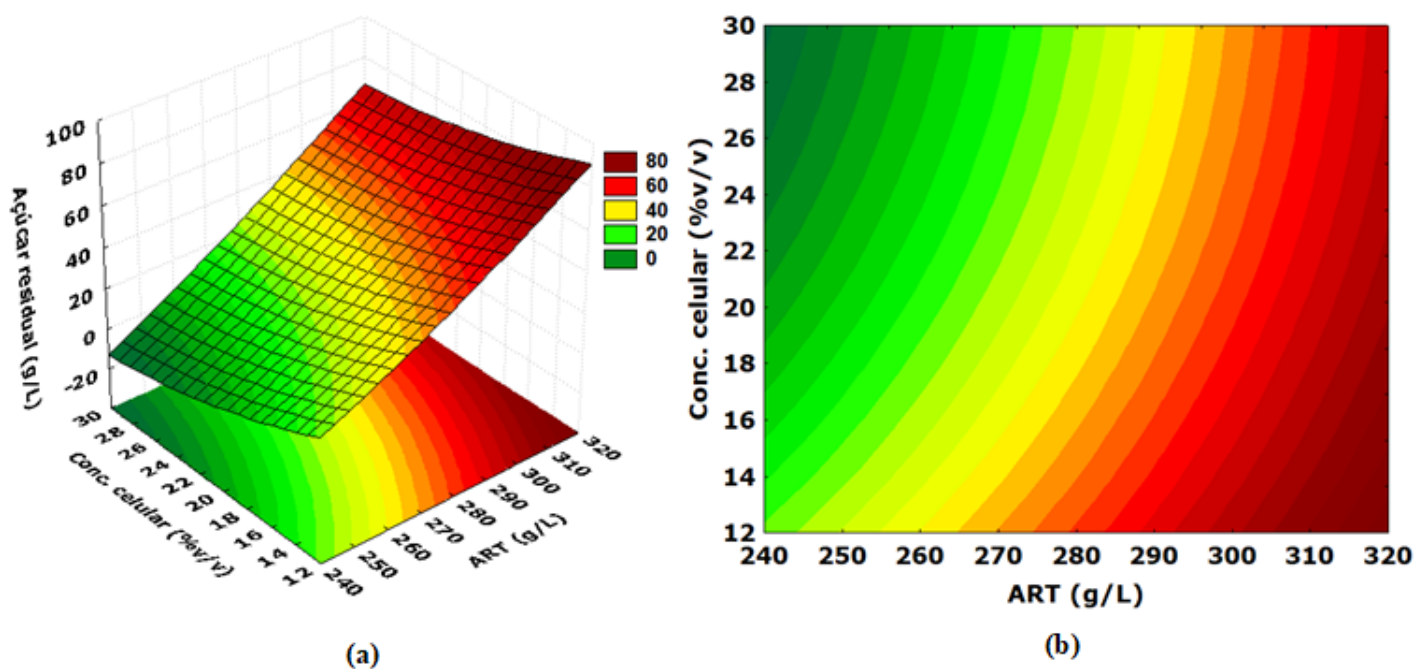


Figura 5.12- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração substrato e concentração celular.



Analisando as curvas de contorno (Figuras 5.10-b e 5.11-b) definiu-se a faixa de temperatura que minimiza o açúcar residual. Visando a uma menor quantidade de açúcar residual ou seu consumo total, a temperatura deve estar entre 26 e 29°C.

Pelas curvas de contorno (Figuras 5.10-b e 5.12-b) definiu-se a faixa de concentração de células que minimiza a resposta em questão. O efeito combinado da temperatura e a concentração celular (Figura 5.10-b) indica que a concentração seja entre 26 e 30%v/v. Já o efeito combinado da concentração de ART no mosto e concentração celular (Figura 5.12-b) indica uma faixa de 24 a 30%v/v. buscando-se que se respeitem ambas as faixas, a concentração celular deve estar entre 26 e 30%v/v.

Da mesma forma que para a temperatura e concentração celular, a partir das curvas de contorno (Figuras 5.11-b e 5.12-b) definiu-se que a concentração de ART no início da fermentação deve-se ser menor que 260 g/L para minimizar a resposta açúcar residual.

Na Tabela 5.1, observa-se que os experimentos 2 e 6 que obteve maiores rendimentos foram aqueles em que o açúcar residual foi baixo e variou de 0,434 a 2,68 g/L, respectivamente.

Pelas análises das superfícies de respostas e curvas de contorno para o tempo de fermentação em 12 horas, conclui-se que para maximizarmos as respostas estudadas rendimento, concentração de etanol, produtividade e minimizarmos a concentração de açúcar residual, a concentração celular deve estar entre 21 e 30%v/v. A temperatura entre 25 e 29°C e para a concentração substrato a faixa deve ser entre 260 e 310 g/L.

Com o intuito de validar o modelo para as respostas rendimento, concentração de etanol, produtividade e açúcar residual, além da análise estatística das superfícies de resposta e curvas de contorno, foram calculados os valores ótimos de temperatura, concentração de substrato e concentração celular para o tempo de fermentação em 12 horas. A fim de se obter os pontos estacionários que minimiza (açúcar residual) e maximiza (rendimento, concentração de etanol e produtividade), realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados nas tabelas apresentadas anteriormente para cada resposta em estudo. . Utilizou-se o *Software Maple Release 18* e aplicando os comandos *maximize* e *minimize* foram obtidos os pontos ótimos locais que estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Valores ótimos para o tempo de 12 horas de fermentação.

	Temperatura (°C)	Concentração Substrato (g/L)	Concentração celular (%v/v)
Rend12h (%)	26	240	28
Etan12h (g/L)	29	308	30
Prod12h (g/L.h)	29	311	30
ART12h (g/L)	28	240	30

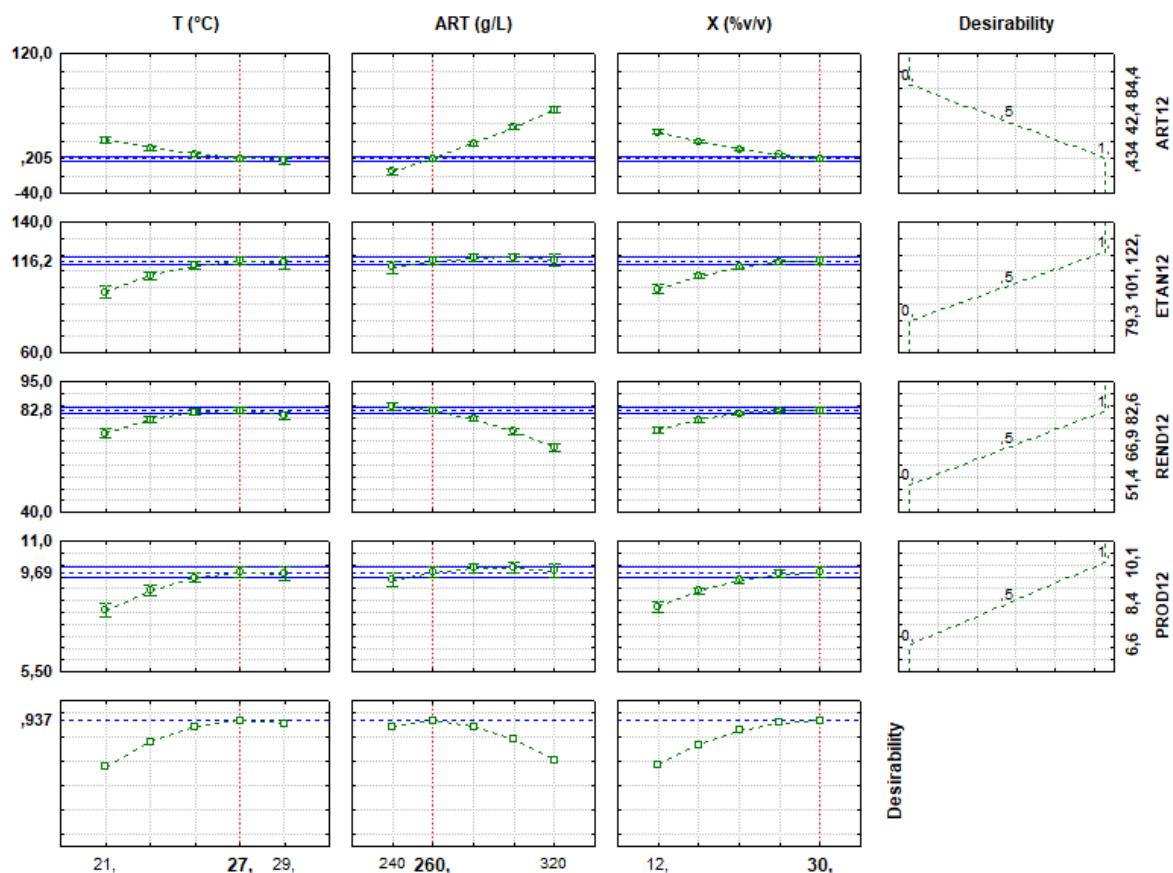
De acordo com a Tabela 5.6, observa-se que os valores encontrados pela otimização para cada resposta em estudo, estão em concordância às análises anteriores (feitas através das superfícies de resposta e curvas de contorno) já que todas as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

Para uma maior confiabilidade das faixas obtidas foi utilizada a função de desejabilidade presente no *Software* Statistica 7.0 e proposta por Derringer e R. Suich em 1980, que é uma técnica de otimização simultânea que consiste em encontrar os valores das variáveis independentes (fatores) que otimizem uma ou mais respostas, ou no mínimo as mantenham em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não linear. Inicialmente essa função converte cada resposta y_i em uma função individual de desejabilidade d_i que varia de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for o valor mais desejável, $d_i=1$, caso contrário, $d_i=0$ e a resposta está fora da região aceitável (PIMENTA et al., 2014). Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global (D), que é dada pela média geométrica das desejabilidades individuais (d_i).

A Figura 5.13 mostra os perfis de desejabilidades individuais e globais nas condições estabelecidas para esta análise. As variáveis otimizadas foram: temperatura, concentração de substrato e concentração celular, enquanto as funções de desejabilidade individuais utilizadas tiveram como objetivo maximizar as respostas (rendimento, concentração de etanol e produtividade) e minimizar a resposta açúcar residual.

Observando a Figura 5.13, verifica-se que os três primeiros perfis são relativos à variação da concentração de açúcar residual com cada fator. O quarto perfil mostra a desejabilidade do açúcar residual, ou seja, a faixa da resposta de desejabilidade aceitável ($0 \leq d_i \leq 1$). Os demais perfis são relativos à variação da concentração de etanol, do rendimento e da produtividade com cada fator, respectivamente. E os três últimos perfis mostram a desejabilidade individual para cada fator e a desejabilidade global igual a 0,937.

Neste contexto, foram determinadas as condições que otimiza simultaneamente as respostas em questão. Para 12 horas de fermentação, as melhores condições para a fermentação alcoólica são 27°C a temperatura; 260 g/L a concentração inicial de substrato e a 30%v/v a concentração celular. A desejabilidade global máxima atingida foi igual a 0,937. Este valor pode variar de 0 a 1. E quanto mais próximo da unidade for este valor, melhor para a otimização simultânea, ou seja, fornece um nível adequado de confiabilidade do método.

Figura 5.13 – Perfis da função *Desirability* para 12 horas de fermentação.

5.1.2 DCC para 24 horas de fermentação

A Tabela 5.7 mostra os valores codificados e nominais das variáveis de estudo e as respostas rendimento (Y_1), concentração de etanol (Y_2), produtividade (Y_3) e açúcar residual (Y_4).

Observa-se na Tabela 5.7 que no tempo igual a 24 horas de fermentação, o rendimento variou entre 74,47% (experimento 3) e 90,21% (experimento 6), a concentração de etanol entre 102,94 g/L (experimento 1) e 137,4 g/L (experimento 12), a produtividade esteve entre 4,29 g_{etanol}/L.h (experimento 1) e 5,72 g_{etanol}/L.h (experimento 12) e a concentração de açúcar residual variou de 0 (experimentos 2 e 6) a 10,72 g/L (experimento 3). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação para todas as respostas indicando uma boa repetibilidade do processo.

Tabela 5.7 – Valores codificados e nominais e suas respostas em 24 horas de fermentação.

Experimentos	Valor nominal (valor codificado)			Y ₁ (%)	Y ₂ (g/L)	Y ₃ (g _{etanol} /L.h)	Y ₄ (g/L)
	X ₁ (°C)	X ₂ (g/L)	X ₃ (% v/v)				
1	22 (-1)	250 (-1)	14 (-1)	80,58	102,94	4,29	1,76
2	22 (-1)	250 (-1)	28 (+1)	82,97	106,00	4,42	0,1
3	22 (-1)	310 (+1)	14 (-1)	74,47	117,97	4,92	10,72
4	22 (-1)	310 (+1)	28 (+1)	83,10	131,65	5,49	8,06
5	28 (+1)	250 (-1)	14 (-1)	82,59	105,51	4,40	1,39
6	28 (+1)	250 (-1)	28 (+1)	90,21	115,24	4,80	0
7	28 (+1)	310 (+1)	14 (-1)	80,11	126,91	5,29	9,98
8	28 (+1)	310 (+1)	28 (+1)	84,35	133,62	5,57	4,88
9	21 (-α)	280 (0)	21 (0)	81,71	116,91	4,87	8,07
10	29 (+α)	280 (0)	21 (0)	85,06	121,7	5,07	2,98
11	25 (0)	240 (-α)	21 (0)	84,86	104,07	4,34	0,65
12	25 (0)	320 (+α)	21 (0)	83,99	137,4	5,72	5,35
13	25 (0)	280 (0)	12 (-α)	83,54	119,5	4,98	6,75
14	25 (0)	280 (0)	30 (+α)	84,46	120,9	5,04	1,11
15	25 (0)	280 (0)	21 (0)	87,09	125,04	5,22	0,89
16	25 (0)	280 (0)	21 (0)	87,35	124,98	5,21	0,85
17	25 (0)	280 (0)	21 (0)	87,85	125,68	5,24	0,87

Pode-se observar que no tempo de 24 horas obtiveram-se maiores rendimentos em relação ao tempo de 12 horas, isso deve ao fato que neste tempo ainda havia muitos experimentos com elevadas quantidades de açúcares residuais, necessitando-se de mais tempo para a conversão dos mesmos em etanol. Além disso, tempos maiores podem comprometer os valores da produtividade obtidos na fermentação, tal como mostrado na Tabela 5.7.

Neste DCC foi considerado um nível de significância de 90%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0,1$. A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.7, foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta. Para isto, determinaram-se os coeficientes de regressão após a realização da regressão múltipla no programa Statistica ®7.0.

5.1.2.1 Rendimento (Y₁)

A partir dos dados obtidos na Tabela 5.7, analisou-se estatisticamente o comportamento da resposta rendimento. Dessa maneira, determinou-se os coeficientes de

regressão das variáveis e interações, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos, conforme a Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_1 para 24h.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	p
Termo independente	87,15348	0,000005
X_1 (L)	1,78216	0,003990
X_1 (Q)	-1,94167	0,006007
X_2 (L)	-1,33708	0,007056
X_2 (Q)	-1,35444	0,012229
X_3 (L)	2,12905	0,002863
X_3 (Q)	-1,69947	0,008513
X_1X_2	-0,29446	0,162232
X_1X_3	0,10286	0,527618
X_2X_3	0,35728	0,119057
$R^2 = 0,83$		

Para o nível de significância adotado, os parâmetros não significativos que puderam ser desprezados foram as interações entre as variáveis X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 . Na Equação 12 está apresentado o modelo com as variáveis significativas codificadas.

$$Y_1 (\%) = 87,15 + 1,78X_1 - 1,94X_1^2 - 1,34X_2 - 1,35X_2^2 + 2,13X_3 - 1,69X_3^2 \quad (12)$$

Após o ajuste o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,82, indicando que 82% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. Pela Equação 12, o sinal negativo do coeficiente X_2 indica que um aumento da concentração de substrato no mosto gera uma redução no rendimento. Além disso, pode-se notar que as variáveis X_1 e X_3 contribuem consideravelmente para o aumento da resposta rendimento. Baseando-se na Tabela 5.7, confirma tais interpretações dadas ao modelo, em observação aos experimentos 1 e 6, verifica-se para $X_1=22^\circ\text{C}$ e $X_3=14\%\text{v/v}$, um rendimento de 80,58% enquanto para $X_1=28^\circ\text{C}$ e $X_3=28\%\text{v/v}$ de 90,21%, respectivamente, sendo que maiores concentrações celulares no reator produzem maiores rendimentos, tais como nos experimentos 3 e 4; 5 e 6. No entanto, é claro que há um limite para esse aumento, sendo determinado pelo custo/benefício e operação.

Pacheco (2010), utilizando um reator tipo torre com escoamento ascendente e recirculação externa empregando uma cepa de levedura de característica floculante, concluiu que a concentração celular no inóculo foi a variável que mais afetou a respostas rendimento.

Um aumento na concentração celular no inóculo provoca um aumento no rendimento e diminui os níveis residuais de sacarose.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões de interesse para a resposta rendimento em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente. Sendo assim, segue abaixo as Figuras 5.14, 5.15 e 5.16 com as respectivas superfícies de resposta e curvas de contorno.

Figura 5.14 - Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento (%) em função da concentração celular e temperatura.

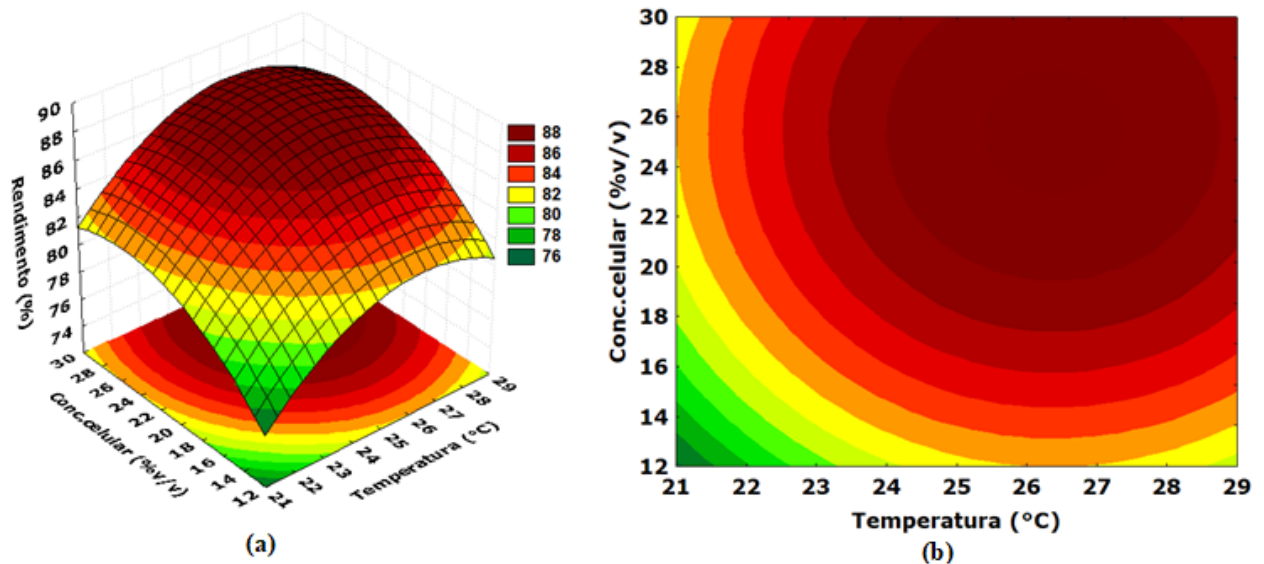


Figura 5.15- Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento (%) em função da concentração de substrato e temperatura.

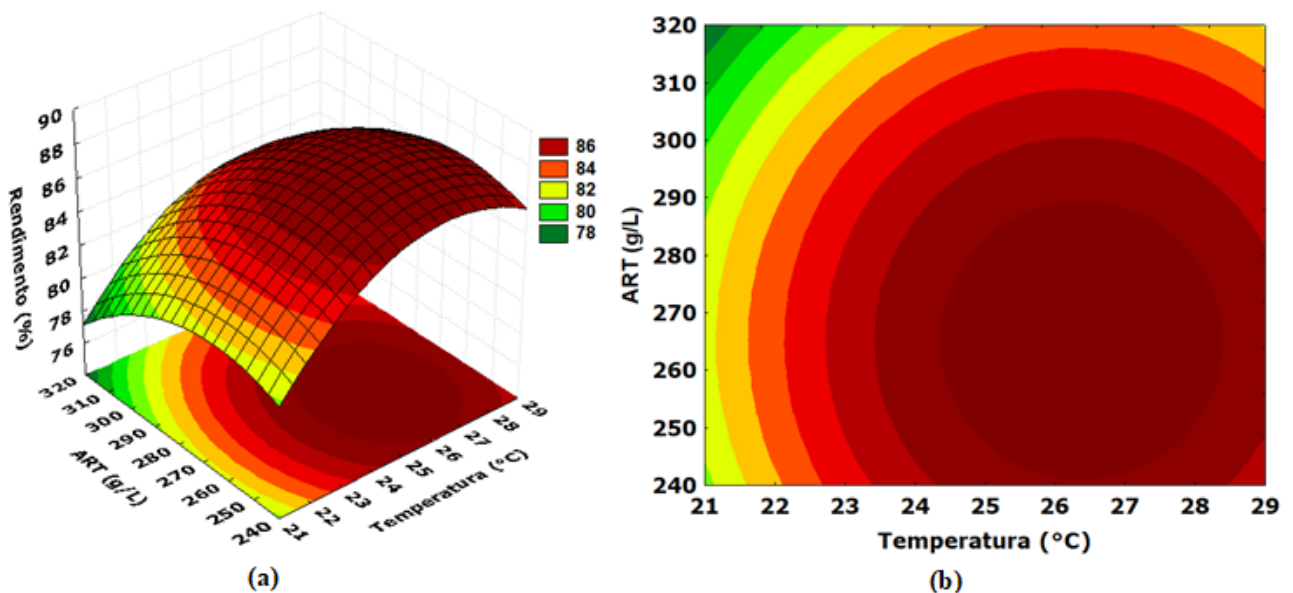
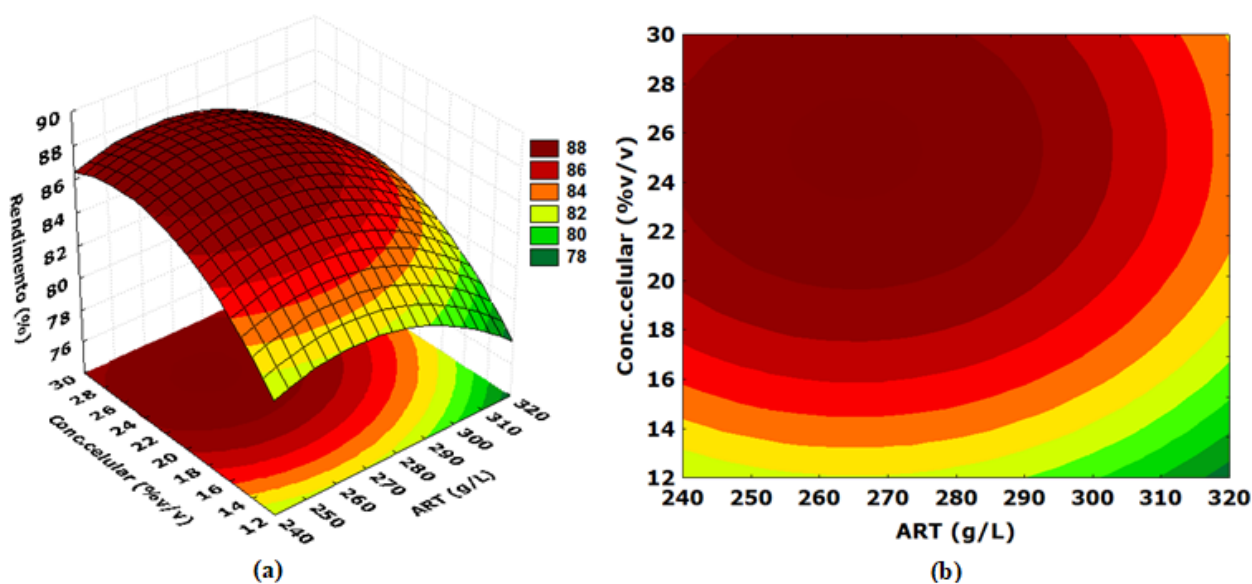


Figura 5.16- Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta rendimento (%) em função da concentração de substrato e concentração celular.



A partir das curvas de contorno definiram-se as faixas de temperatura, concentração de substrato e concentração celular que maximiza a resposta rendimento.

Na curva de contorno (Figura 5.14-b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração celular no reator, assim como a que representa o efeito combinado da temperatura com a concentração de ART (Figura 5.15-b) indicam uma maximização do rendimento em uma faixa de 24 a 29°C. Logo, é uma faixa que satisfaz ambos os efeitos combinados, ou seja, pode-se afirmar que para a maximização do rendimento na produção de etanol, dentro da região experimental trabalhada, a temperatura deve estar entre 24-29°C.

Da mesma forma, a mesma análise foi feita para a concentração celular. Através das curvas de contorno (Figuras 5.14-b e 5.16-b), definiu-se a faixa de concentração celular no reator que maximiza a resposta rendimento. A faixa de concentração celular correspondente ao máximo rendimento engloba valores entre 20 a 30%v/v para ambos os efeitos combinados.

Analisando as curvas de contorno (Figuras 5.15-b e 5.16-b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração de substrato e o efeito combinado da concentração celular e da concentração substrato, buscando-se uma faixa que combinou ambos os efeitos em sinergismo, pode-se afirmar que para a maximização do rendimento, na região experimental adotada, a faixa deve estar entre 240 a 300 g/L.

Na Tabela 5.7, o experimento que obteve o maior rendimento foi o 6, em que a temperatura foi de 28°C, a concentração de substrato de 250 g/L e a concentração celular de

28% v/v, sendo estes, valores dentro das faixas obtidas para temperatura, concentração de substrato e concentração celular.

5.1.2.2 Concentração de etanol (Y_2)

Os coeficientes de regressão para a resposta concentração de etanol 24h estão apresentados na Tabela 5.9.

Os parâmetros não significativos, que puderam ser desprezados para o nível de significância adotado, foram as interações entre as variáveis X_1X_2 e X_1X_3 , em que a variável X_1 não exerceu influência significativa sobre a concentração de etanol por interações com as outras variáveis.

Tabela 5.9 - Coeficientes de regressão para a resposta Y_2 em 24h.

Variáveis e interações	Coeficiente de regressão	p
Termo independente	124,8792	0,000003
X_1 (L)	2,5187	0,002108
X_1 (Q)	-2,9031	0,002841
X_2 (L)	10,8038	0,000115
X_2 (Q)	-2,1122	0,005347
X_3 (L)	3,0850	0,001438
X_3 (Q)	-2,5679	0,003951
X_1X_2	-0,1122	0,504766
X_1X_3	-0,0372	0,814204
X_2X_3	0,9497	0,020817
$R^2 = 0,96$		

Para a Equação 13, o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,96. Este resultado indica que 96% dos dados experimentais se encaixam no modelo apresentado a seguir.

$$Y_2 \text{ (g/L)} = 124,9 + 2,52X_1 - 2,90X_1^2 + 10,80X_2 - 2,11X_2^2 + 3,09X_3 - 2,57X_3^2 + 0,95X_2X_3 \quad (13)$$

Analisando os coeficientes das variáveis X_1 , X_2 e X_3 na Equação 13 verifica-se que para a resposta concentração de etanol a variável com maior influência foi a concentração de substrato seguida pela concentração celular e temperatura. Os valores positivos para os coeficientes das variáveis indicam que, fermentações realizadas em altas temperatura, concentração de substrato e de células, a concentração de etanol aumenta. Este resultado é exemplificado comparando os experimentos 1 e 8 listados na Tabela 5.7.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir as regiões de interesse. Serão apresentadas graficamente duas a duas junto à resposta avaliada. Sendo assim, segue abaixo as Figura 5.17, 5.18 e 5.19 que ilustram as superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta concentração de etanol em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.17 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol (g/L) em função da concentração celular e temperatura.

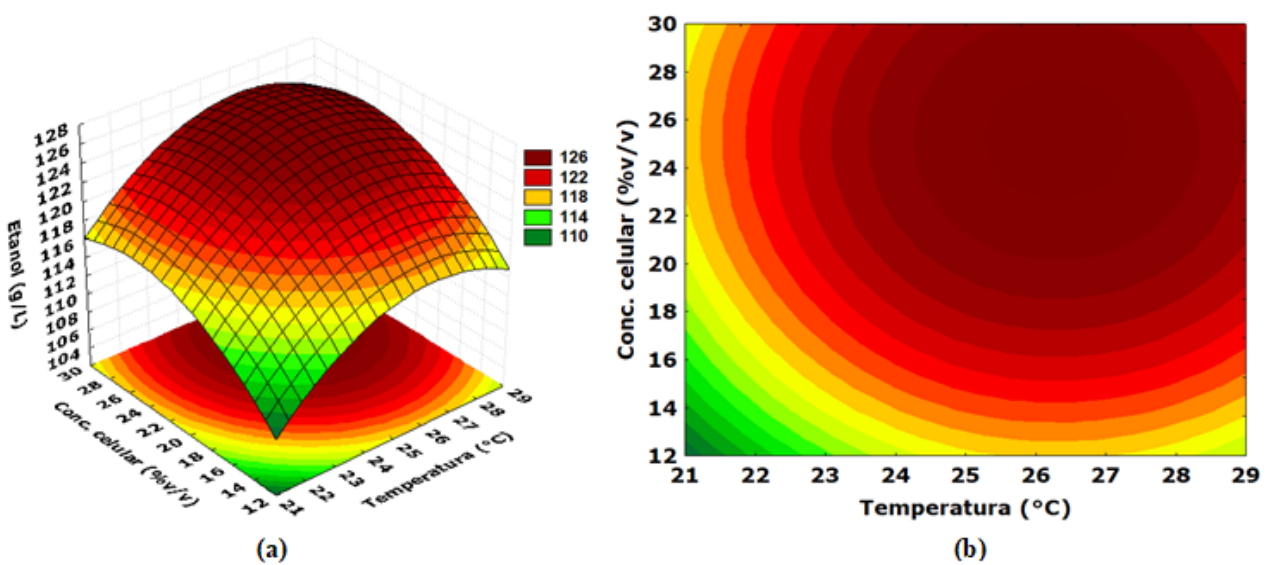


Figura 5.18- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol (g/L) em função da concentração substrato e temperatura.

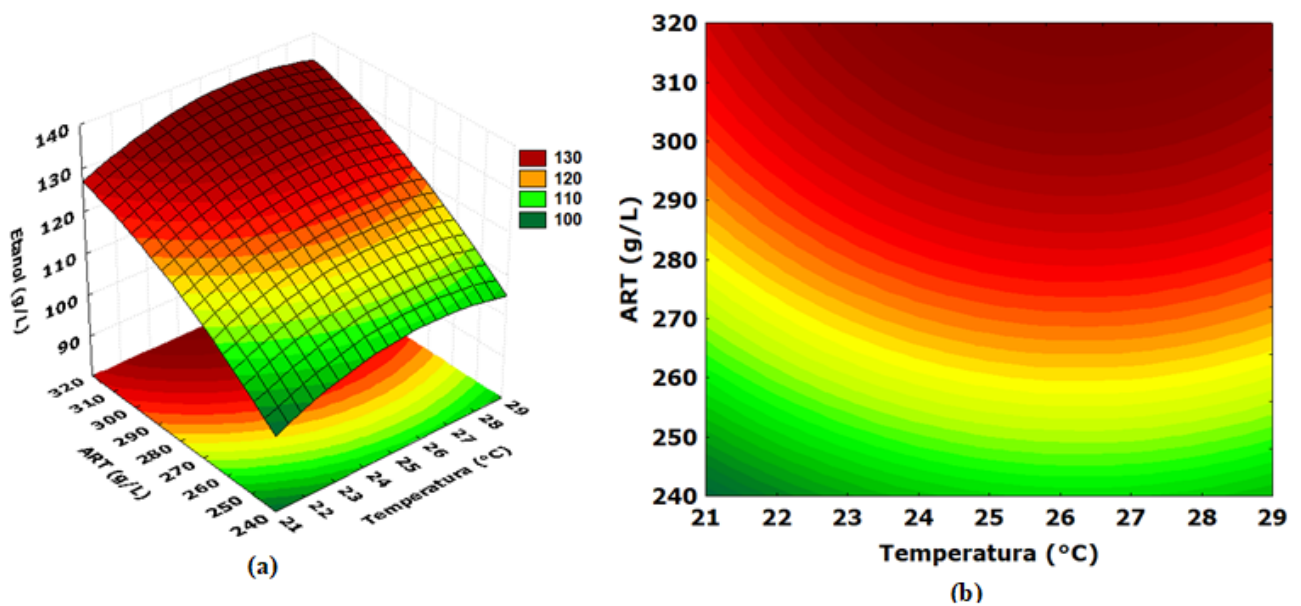
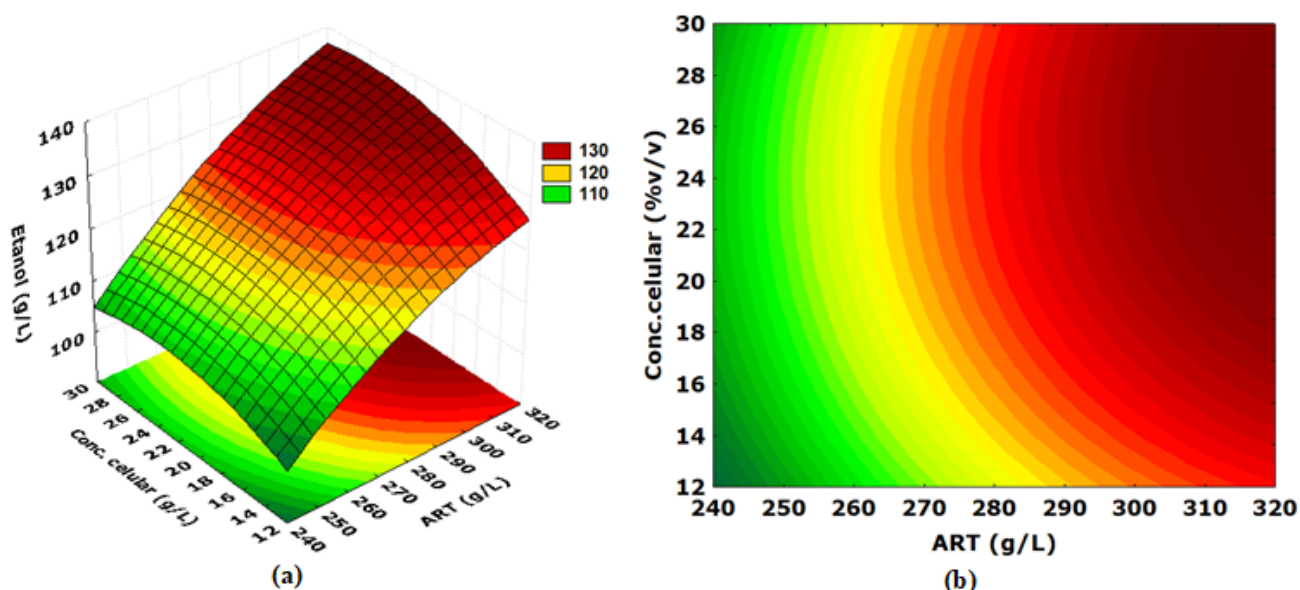


Figura 5.19- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta concentração de etanol (g/L) em função da concentração celular e concentração substrato.



De acordo com a curva de contorno (Figura 5.17-b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração celular indica uma faixa que engloba valores de temperatura entre 24 e 29°C. O efeito combinado da temperatura e da concentração de ART (Figura 5.18-b) indica uma faixa de temperatura entre 23 e 29°C. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que para maximização da resposta concentração de etanol a temperatura deve estar entre 24 e 29°C.

A fim de se obter a faixa para a concentração celular e que maximiza a resposta em questão, analisando as Figuras 5.17-b e 5.19-b pode-se afirmar que a faixa de concentração celular que satisfaça ambos os efeitos em sinergia, é interessante que a concentração celular esteja entre 20 a 30%v/v.

Da mesma forma que para a temperatura e concentração celular, a partir das curvas de contorno (Figuras 5.18-b e 5.19-b) definiu-se a faixa da concentração de ART que maximiza a resposta em questão. De acordo com esta análise, a faixa da concentração de ART deve estar entre 300 e 320 g/L.

Cruz et al. (2018) em seu experimento realizado com a cepa Y-904 a 26°C com 240 g/L de sacarose como substrato e 35g/L de células adaptadas à temperatura de 4°C por duas vezes consecutivas, obteve rendimento de 93%, teor alcoólico de 14,4%v/v e produtividade de 6g/L.h em 19 horas de processo fermentativo. O experimento deste trabalho que mais se aproxima ao realizado pelo referido autor e colaboradores foi o experimento 6 da Tabela 5.7, onde as condições foram a 28°C, 250g/L de concentração de substrato e 28% (v/v) de

concentração de células. Os resultados obtidos foram bastante semelhantes em rendimento 90,21% e teor alcoólico 14,61%v/v, porém a produtividade foi de 4,8g/L.h devido ao tempo de fermentação ter sido de 24 horas.

5.1.2.3 Produtividade (Y_3)

Analizando estatisticamente o comportamento da resposta produtividade pela Tabela 5.7, determinaram-se os coeficientes de regressão das variáveis e interações com os parâmetros significativos e não significativos, bem como os níveis de significância, conforme a Tabela 5.10.

Tabela 5.10 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_3 em 24h.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	p
Termo independente	5,205030	0,000002
X_1 (L)	0,104944	0,001797
X_1 (Q)	-0,121614	0,002397
X_2 (L)	0,450157	0,000098
X_2 (Q)	-0,088661	0,004495
X_3 (L)	0,128541	0,001225
X_3 (Q)	-0,107671	0,003327
X_1X_2	-0,004676	0,474567
X_1X_3	-0,001551	0,799322
X_2X_3	0,039572	0,017819
$R^2 = 0,96$		

O coeficiente de correlação obtido após o ajuste foi de 0,96, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção da produtividade, mostrando que 96% da variabilidade dos dados foram explicados pelo modelo proposto.

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 14.

$$Y_3 \text{ (g/L.h)} = 5,21 + 0,10X_1 - 0,12X_1^2 + 0,45X_2 - 0,09X_2^2 + 0,13X_3 - 0,11X_3^2 + 0,04X_2X_3 \quad (14)$$

A partir da Equação 14, pode-se observar que os valores positivos para os coeficientes das variáveis X_1 , X_2 e X_3 exercem efeitos positivo sobre a produtividade, sendo que valores mais altos de temperatura, concentração de substrato e concentrações de células, a resposta produtividade aumenta. Essa afirmação pode ser exemplificada comparando os experimentos

1 e 8 listado na Tabela 5.7. Verifica-se que no experimento 1 para a $X_1=22^\circ\text{C}$ $X_2=250\text{ g/L}$ e $X_3=14\%\text{v/v}$ tem-se uma produtividade de $4,29\text{ g/L.h}$ enquanto para o experimento 8 nas condições $X_1=28^\circ\text{C}$, $X_2=310\text{ g/L}$ e $X_3=28\%\text{v/v}$ obteve uma maior produtividade de $5,57\text{ g/L.h}$.

A partir do modelo, foram construídas as superfícies de respostas e assim definido a região de trabalho de maior interesse para o processo. Sendo assim, segue abaixo as Figuras 5.20, 5.21 e 5.22 que ilustram as superfícies de resposta e as curvas de contorno para a resposta produtividade em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.20- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta produtividade (g/L.h) em função da concentração celular e temperatura.

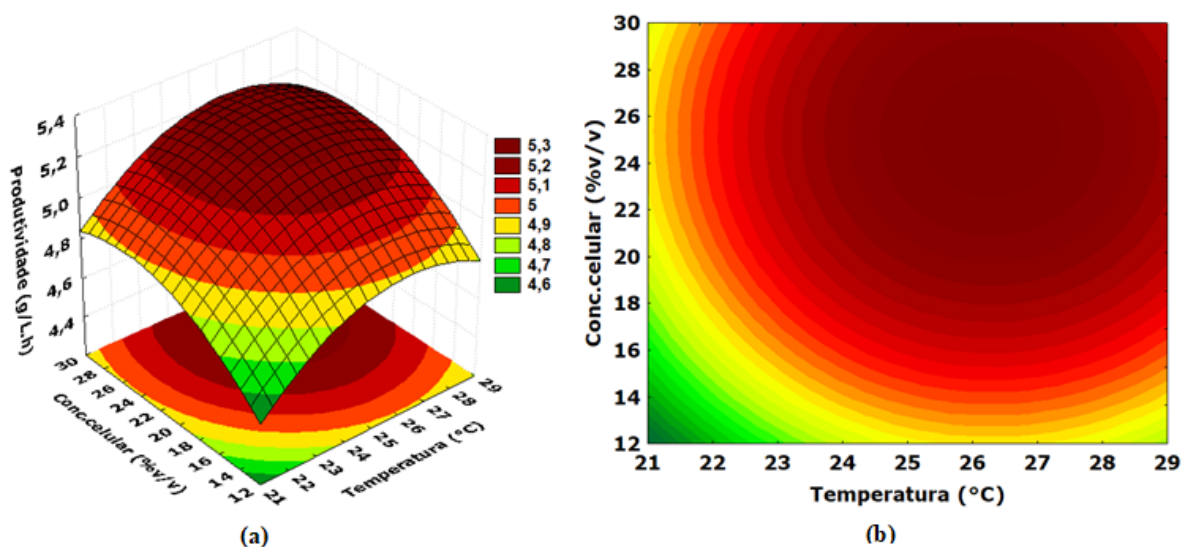


Figura 5.21- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta produtividade (g/L.h) em função da concentração substrato e temperatura

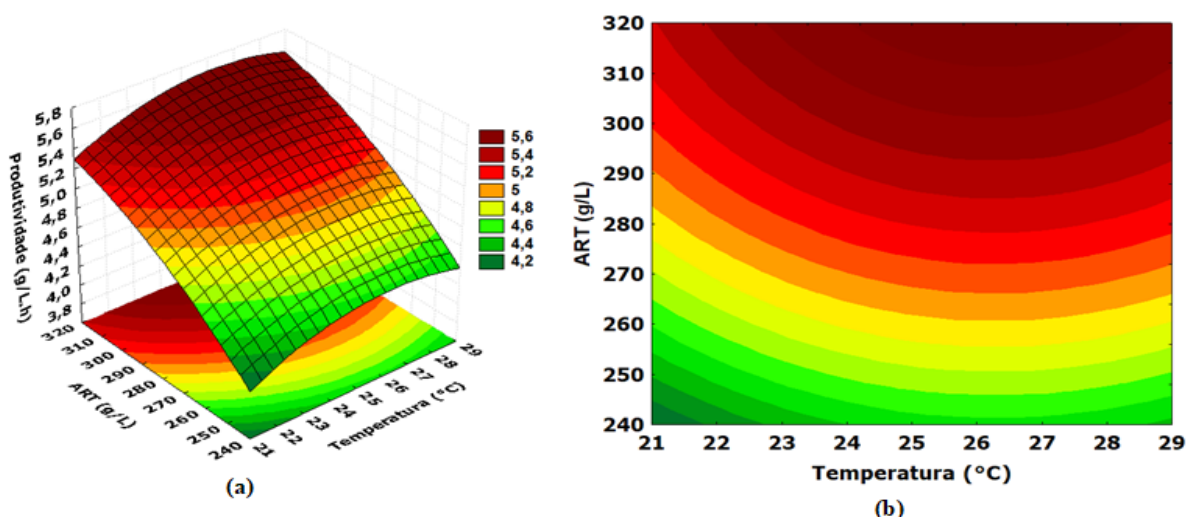
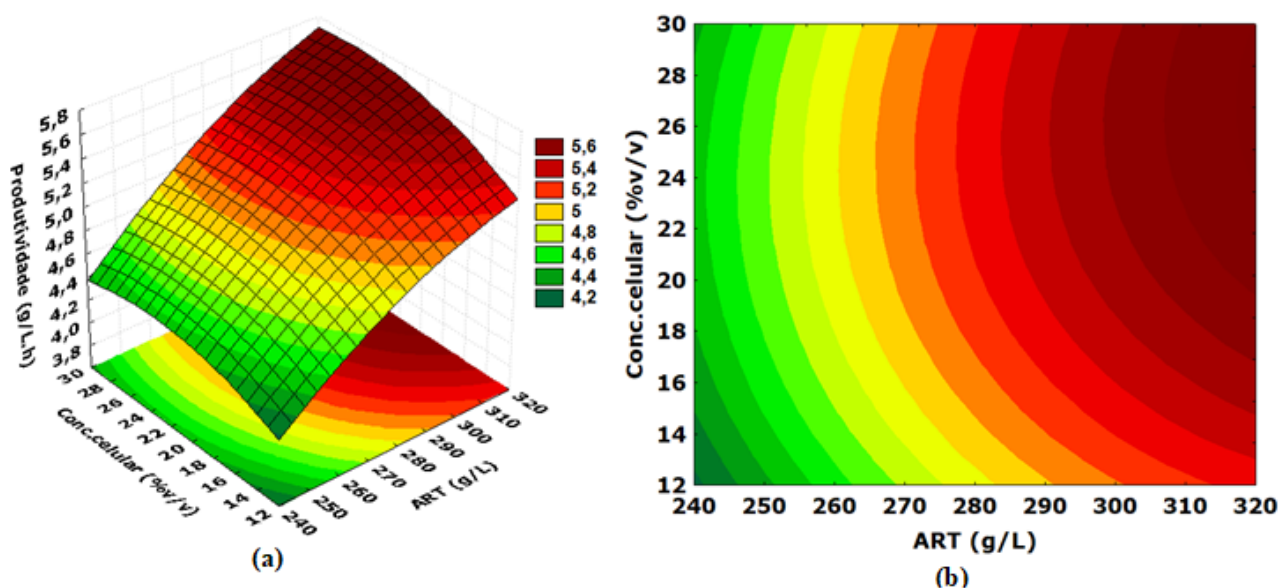


Figura 5.22- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta produtividade (g/L.h) em função da concentração celular e concentração substrato.



Analisando as curvas de contorno das Figuras (5.20-b, 5.21-b e 5.21-b) definiram-se as faixas de temperatura, concentração de substrato e de concentração celular que maximiza a produtividade.

A curva de contorno que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração celular (Figura 5.20-b) indica uma faixa aproximada de 24 a 29°C, para a maximização da resposta em questão. O efeito combinado da temperatura e a concentração substrato (Figura 5.21-b) indica uma faixa de 23 a 29°C. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinado, pode-se afirmar que para maximização da produtividade, dentro da região experimental trabalhada, a temperatura deve estar entre 24 e 29°C.

A mesma análise foi feita para concentração substrato, a partir das curvas de contorno Figuras (5.21-b e 5.22-b). Definiu-se a faixa de concentração de substrato que maximiza a produtividade na região experimental trabalhada, sendo que a faixa correspondente à máxima produtividade engloba a concentração de substrato de 300 a 320 g/L.

Para a definição da concentração celular que maximiza a produtividade foi realizada análise das curvas de contorno (Figuras 5.20-b e 5.22-b) para determinar a faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados e dentro da região experimental de trabalho, a concentração celular no reator deve estar entre 20 e 30%v/v.

O experimento que obteve a maior produtividade foi o experimento 12 listado na Tabela 5.7, em que a temperatura foi de 25°C, a concentração de substrato 320 g/L e a

concentração celular 21% v/v, sendo estes valores intermediários das faixas obtidas para as variáveis independentes.

Nota-se que para uma maior produtividade, é necessário maiores concentrações celulares, o qual fica claro a influência da variável X_3 como evidenciado na Equação 13. Os maiores valores de produtividade obtidos neste DCC foram os que utilizaram maiores concentrações de células, 21 e 28 % v/v, como detalhados na Tabela 5.7.

5.1.2.4 Açúcar residual (Y_4)

Os coeficientes de regressão para a resposta concentração de açúcar residual estão apresentados na Tabela 5.11. Ao contrário das respostas rendimento, concentração de etanol e produtividade, é interessante que o açúcar residual seja minimizado, afinal não se deseja que cessado o processo ainda haja matéria-prima a ser consumida, já que resultaria em prejuízo para a indústria.

Tabela 5.11 – Coeficientes de regressão para a resposta Y_4 em 24h.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	p
Termo independente	1,44298	0,000049
X_1 (L)	-0,98584	0,000035
X_1 (Q)	1,88114	0,000017
X_2 (L)	3,17176	0,000003
X_2 (Q)	0,50608	0,000240
X_3 (L)	-1,59766	0,000014
X_3 (Q)	1,07365	0,000058
X_1X_2	-0,43118	0,000266
X_1X_3	-0,27109	0,000674
X_2X_3	-0,58882	0,000143
$R^2 = 0,766$		

O modelo com as variáveis significativas codificadas está apresentado na Equação 15. O coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,77, o qual indica um ajuste adequado aos dados experimentais na obtenção do açúcar residual, mostrando que 77% da variabilidade dos dados foram explicadas pela equação empírica proposta.

$$Y_4 \text{ (g/L)} = 1,44 - 0,98X_1 + 1,88X_1^2 + 3,17X_2 + 0,51X_2^2 - 1,59X_3 + 1,07X_3^2 - 0,43X_1X_2 - 0,27X_1X_3 - 0,59X_2X_3 \quad (15)$$

Pela análise dos coeficientes das variáveis isoladas na Equação 15 é possível que se façam algumas observações. O sinal positivo do coeficiente X_2 indica que maiores concentrações de substrato no mosto contribuem para um aumento na concentração de açúcar residual no final da fermentação. Fica evidente, também, que o efeito da concentração de substrato se pronuncia de forma mais significativa que o efeito da temperatura e da concentração celular, como era esperado, já que altas concentrações de açúcares redutores no início da fermentação têm maiores concentrações de açúcar residual. O sinal negativo dos coeficientes X_1 e X_3 indica que altas temperatura e concentração celular gera uma redução na concentração de açúcar residual.

Esta análise está em concordância com a Tabela 5.7 na qual, em observação aos pontos axiais relativos a concentração celular, verifica-se para $X_3=12\%v/v$ um açúcar residual de 6,75 g/L enquanto para a $X_3=30\%v/v$ um valor de 1,11 g/L e os pontos axiais relativos a concentração de substrato, o parâmetro de efeito mais expressivo, geram um açúcar residual de 0,65 g/L ($X_2=240$ g/L) e de 5,35 g/L ($X_2=320$ g/L).

A seguir serão apresentadas as Figuras 5.23, 5.24 e 5.25 que ilustram as superfícies de resposta e as curvas de contorno para a resposta açúcar residual em função da temperatura (X_1) e concentração celular (X_3); temperatura (X_1) e concentração de substrato (X_2); e concentração de substrato (X_2) e concentração celular no reator (X_3), respectivamente.

Figura 5.23- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração celular e temperatura.

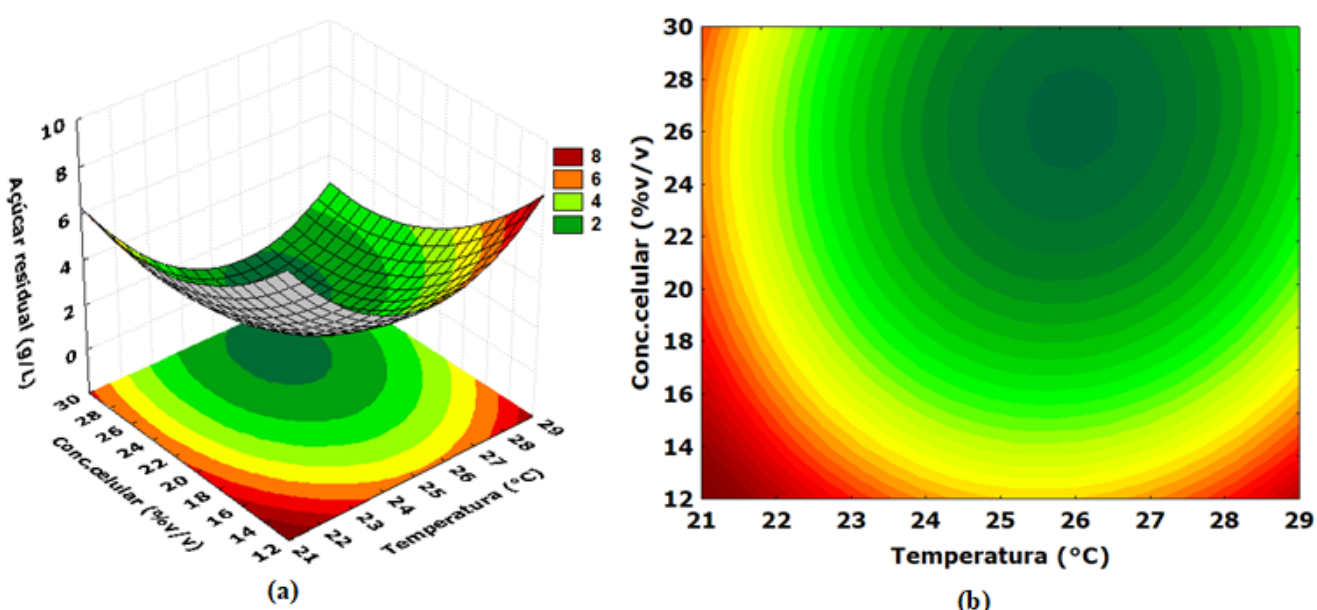


Figura 5.24- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração substrato e temperatura.

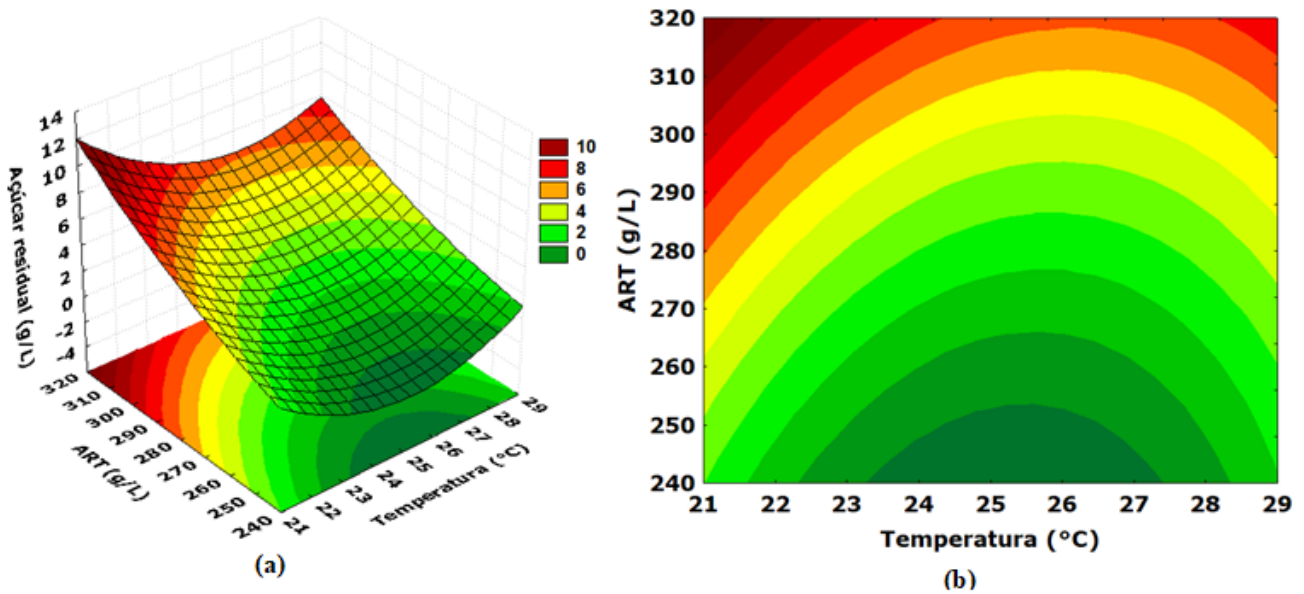
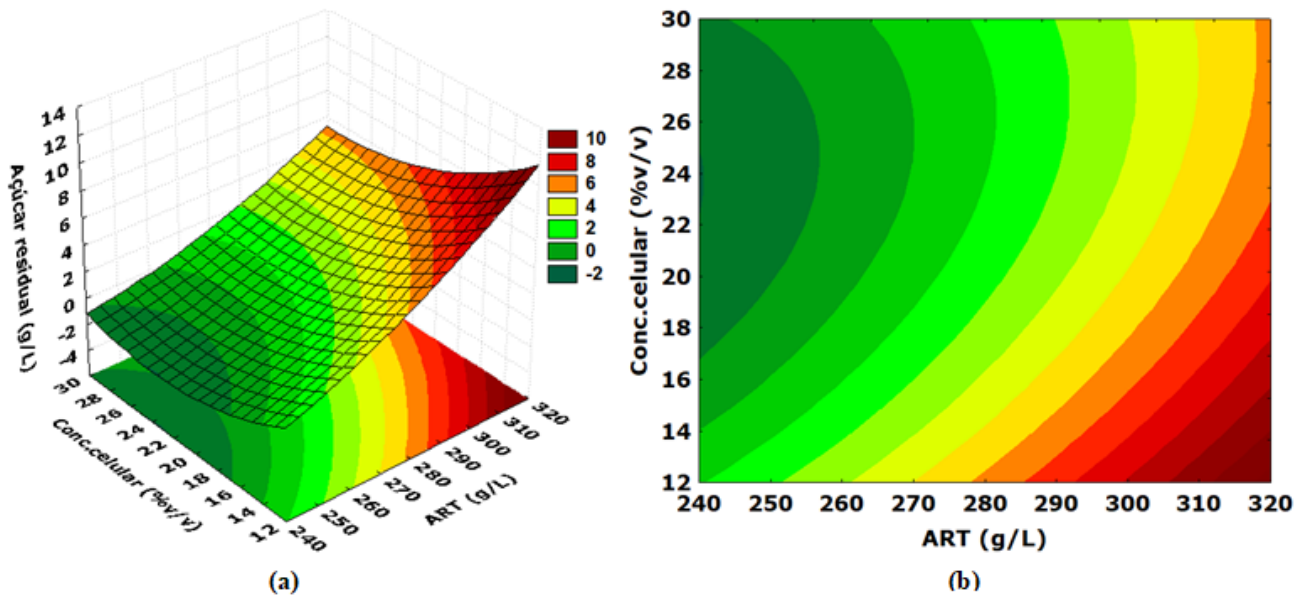


Figura 5.25- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a resposta açúcar residual (g/L) em função da concentração celular e concentração substrato.



Analisando a curva de contorno (Figura 5.23-b) que representa o efeito da temperatura em combinação com a concentração celular, indica que para a minimização da resposta açúcar residual, a faixa da temperatura deve estar entre 24 e 28°C. Já o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração substrato (Figura 5.24-b) indica uma faixa de temperatura aproximadamente entre 23 a 28°C. Logo, a faixa de temperatura combinada de ambos os efeitos deve estar entre 24 a 28°C.

A curva de contorno (Figura 5.23-b) que representa o efeito combinado da temperatura e concentração celular indica uma faixa aproximada de concentração celular de 22 a 30%v/v para minimização da resposta em questão. O efeito combinado da concentração celular e da concentração de substrato no mosto (Figura 5.25-b) indica uma faixa entre 18 e 30%v/v. Buscando-se uma faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados, pode-se afirmar que, para minimização da resposta açúcar residual, na região experimental adotada, a concentração de células deve ser entre 22 e 30%v/v.

Da mesma forma para a concentração substrato, analisando a curva de contorno (Figura 5.24-b) que representa o efeito da temperatura em sinergismo com a concentração substrato e a que representa o efeito combinado da concentração substrato e da concentração celular no reator (Figura 5.25-b) a faixa que satisfaça ambos os efeitos combinados para a minimização do açúcar residual é interessante que a concentração de substrato esteja até 280 g/L.

Pelas análises das superfícies de respostas e curvas de contorno, conclui-se que para maximizarmos as respostas estudadas rendimento, concentração de etanol, produtividade e minimizarmos a concentração de açúcar residual no tempo de fermentação de 24 horas, a concentração celular deve ser alta para atender todas as respostas, estando assim entre 20 e 30%v/v. A temperatura deve estar entre 24 e 29°C e para a concentração substrato a faixa deve ser entre 280 e 320 g/L.

Para validar o modelo para as respostas rendimento, concentração de etanol, produtividade e açúcar residual, além da análise estatística das superfícies de resposta e curvas de contorno, foi calculado os valores ótimos de temperatura, concentração de substrato e concentração celular para o tempo de fermentação de 24 horas. A fim de se obter os pontos estacionários que minimiza (açúcar residual) e maximiza (rendimento e produtividade), realizou-se uma análise canônica utilizando o modelo completo representado pelos coeficientes de regressão mostrados nas tabelas apresentadas anteriormente para cada resposta em estudo. Utilizou-se o *Software Maple Release 18* e aplicando os comandos *maximize* e *minimize* foram obtidos os pontos ótimos locais que estão apresentados na Tabela 5.12.

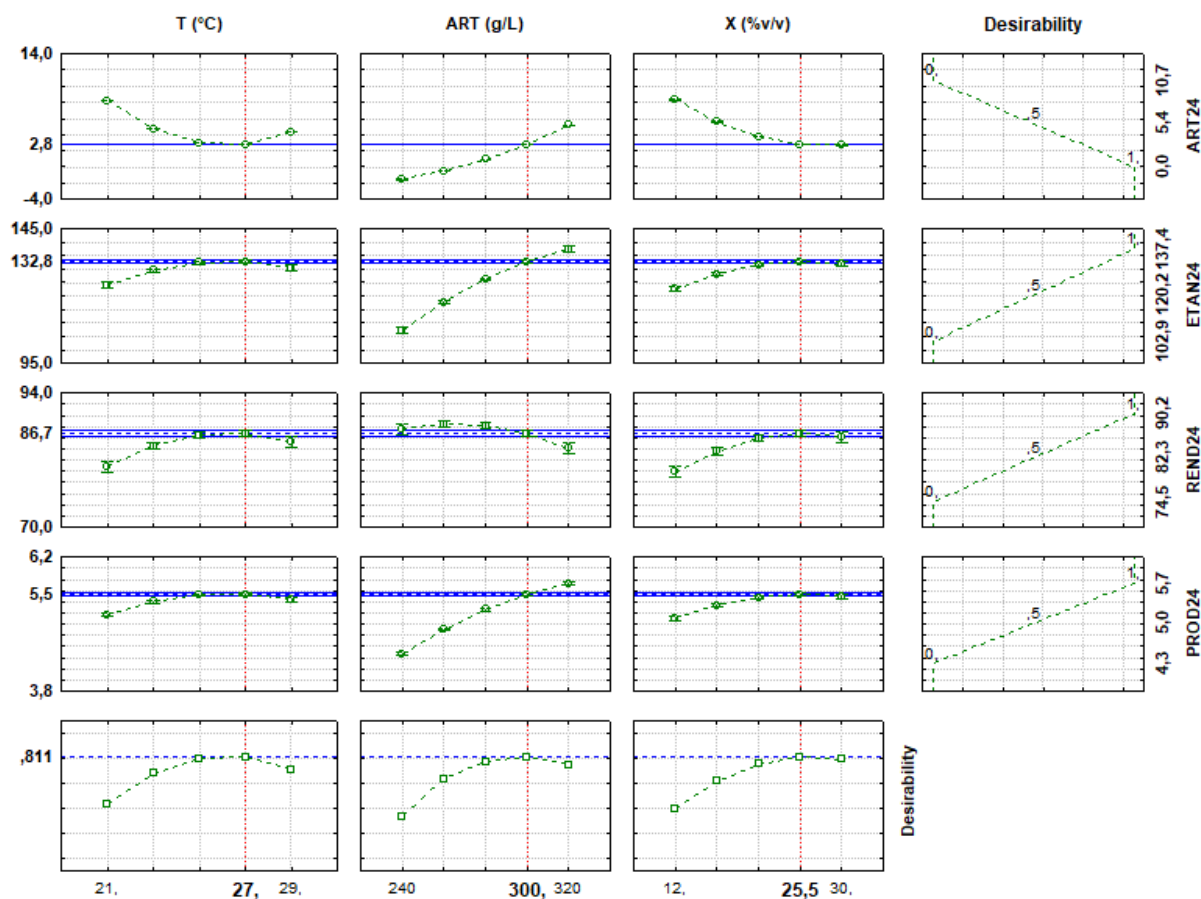
Tabela 5.12 – Valores ótimos para os tempos de 24 horas de fermentação.

	Temperatura (°C)	Concentração Substrato (g/L)	Concentração celular (%v/v)
Rend24h (%)	27	266	25
Etan24h (g/L)	26	320	27
Prod24h (g/L.h)	26	320	27
ART24h (g/L)	25	240	24

De acordo com a Tabela 5.12, observa-se que os valores encontrados pela otimização para cada resposta em estudo, estão em concordância às análises anteriores (feitas através das superfícies de resposta e curvas de contorno) já que todas as variáveis determinadas se encontram dentro da faixa definida.

Para uma maior confiabilidade das faixas obtidas foi utilizado o método da função *Desirability* do Statistica® 7.0 para obter os valores ótimos dos parâmetros investigados. A Figura 5.26 mostra os perfis de desejabilidades individuais e globais nas condições estabelecidas para esta análise.

Figura 5.26 – Perfis da função *Desirability* para 24 horas de fermentação.



Assim, os três últimos perfis mostram a desejabilidade individual para cada fator e a desejabilidade global máxima atingida que foi igual a 0,811. Valor este que fornece um nível adequado de confiabilidade do método, já que é próximo de 1. Desta forma, as melhores condições para a fermentação são 27°C a temperatura; 300 g/L de concentração de substrato e 26%v/v de concentração celular.

De acordo com os resultados obtidos tanto pelo Statistica 7.0 (superfícies de resposta e a função desejabilidade) e o *Maple* 18 para os tempos de 12 e 24 horas, foi possível determinar as condições experimentais para serem validadas experimentalmente. Logo, optou-se por trabalhar com temperaturas a 20, 24 e 27°C, concentração celular de 28 e 30% v/v e concentração de substrato a 260, 290 e 300 g/L na tentativa de maximizar as respostas rendimento, concentração de etanol, produtividade e minimizar a concentração de açúcar residual.

5.2 Experimentos de validação

Nesta etapa, o principal objetivo foi verificar se empregadas às condições experimentais indicadas pela análise *Statistica*® 7.0 (superfícies de resposta e a função desejabilidade) nos tempos de 12 e 24 horas, as respostas obtidas seriam satisfatórias.

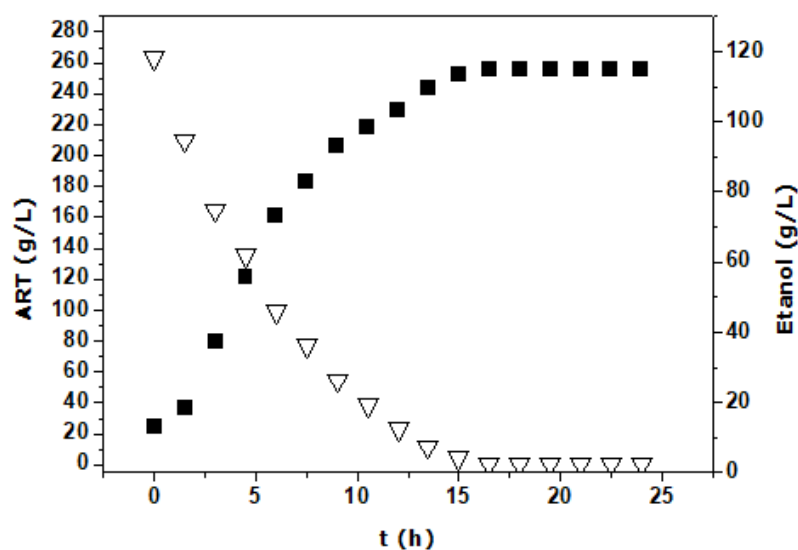
Para realização dos experimentos, as condições para a validação a serem reproduzidas experimentalmente, estão apresentadas na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Condições experimentais para as validações.

	Temperatura (°C)	Conc. Substrato (g/L)	Conc. Celular (%v/v)
1º validação	20	260	28
	27	260	28
2º validação	20	290	28
	27	290	28
3º validação	24	300	30

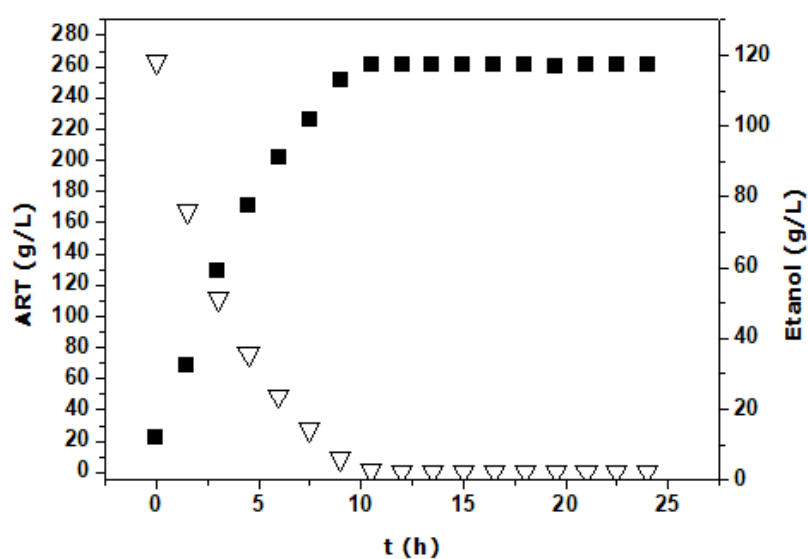
Na Figura 5.27 pode-se observar os perfis de consumo de açúcares e produção de etanol em função do tempo para as condições estabelecidas para 1º validação. Para a condição a 20°C obteve-se no tempo final de fermentação de 18 horas um rendimento 85,39%, produtividade de 6,39 g_{etanol}/L.h e teor alcoólico de 14,58°GL com consumo total do substrato.

Figura 5.27 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 1ª validação a 20°C.



A Figura 5.28 mostra os perfis de concentração de ART e etanol na fermentação conduzida a 27°C, em batelada. A concentração inicial de ART foi de 260 g/L e a concentração celular de 28%v/v. Após 10,5 horas de fermentação, o teor alcoólico atingiu 14,85°GL, com um rendimento em etanol de 87,18%, produtividade de 11,16 g/L.h e consumo total do substrato.

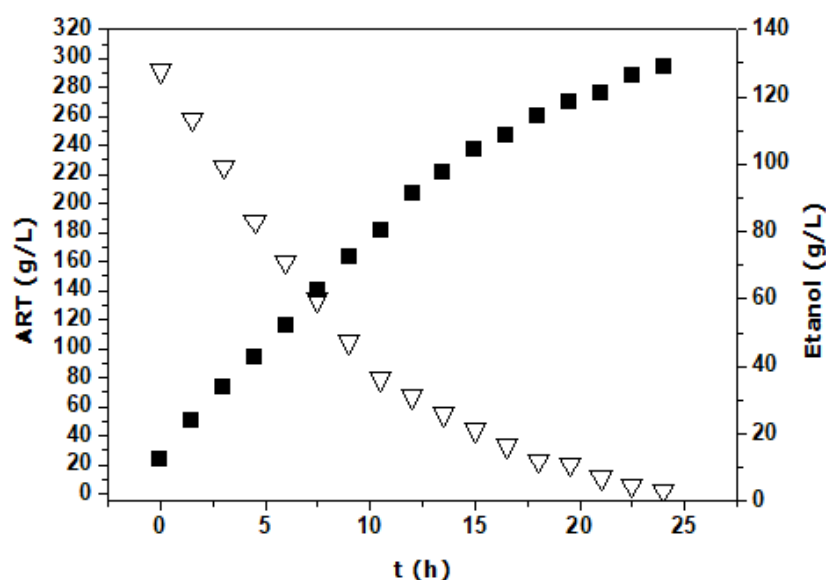
Figura 5.28 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 1ª validação a 27°C.



Na Figura 5.29 pode-se observar os perfis de consumo de açúcares e produção de etanol em função do tempo para as condições estabelecidas para 2ª validação. Para a condição

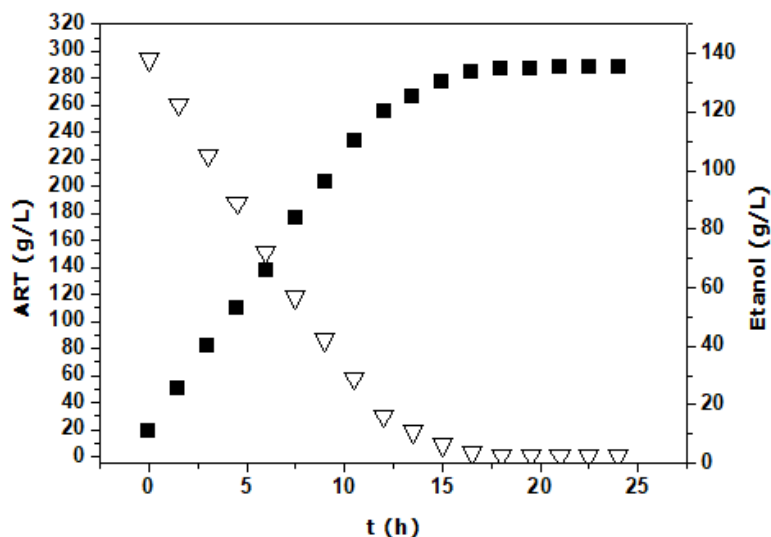
a 20°C, concentração inicial de ART de 290 g/L e concentração celular de 28%v/v, obteve-se no tempo final de fermentação de 24 horas um rendimento 86,56%, produtividade de 5,37 g_{etanol}/L.h e teor alcoólico de 16,34°GL, com açúcar residual de 2,38 g/L.

Figura 5.29 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 2ª validação a 20°C.



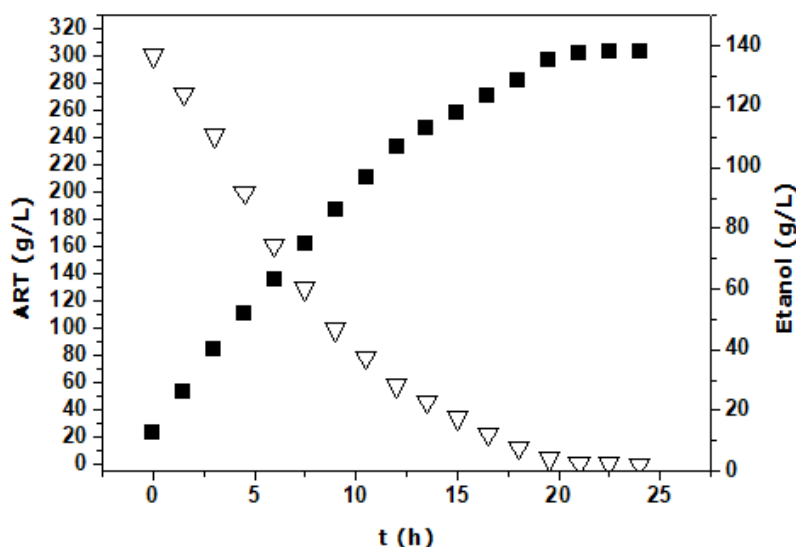
A Figura 5.30 mostra os perfis de concentração de substrato e concentração de etanol em função do tempo, para a condição a 27°C, com concentração inicial de ART de 290 g/L e concentração celular de 28%v/v, atingiu-se no tempo final de fermentação de 19,5 horas um rendimento de 89,88%, produtividade de 6,92 g_{etanol}/L.h e teor alcoólico de 17,11°GL e consumo total do substrato.

Figura 5.30 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 2ª validação a 27°C.



E na Figura 5.31 pode-se observar os perfis de consumo de açúcares e produção de etanol em função do tempo para as condições estabelecidas para 3ª validação. Obteve-se no tempo final de fermentação de 22,5 horas um rendimento 89,64%, produtividade de 6,13 g_{etanol}/L.h e teor alcoólico de 17,48°GL, com consumo total do substrato.

Figura 5.31 – Perfis de concentração de etanol (■) e substrato (▽) em função do tempo para a 3ª validação.



Para avaliar os possíveis resultados das respostas estudadas no tempo de 12 e 24 horas, mesmo tempo estudado no DCC, fez-se necessário a obtenção das equações em termos das variáveis não codificadas, substituindo as equações 5, 6 e 7 nas equações modelo apresentadas pelos coeficientes de regressão. Assim, obtendo as equações em termos das variáveis não codificadas e substituindo os valores de temperatura, concentração de substrato e celular da Tabela 5.13, obtêm-se os valores preditos pelo modelo de acordo com a Tabela 5.14.

A Tabela 5.14 mostra os resultados obtidos pelos ensaios de validação experimental e os preditos. Pode-se perceber que para as variáveis em estudo (exceto para Y_4 24h) os resultados experimentais assemelham-se aos resultados preditos. Porém, para a variável Y_4 24h observa-se maior imprecisão do modelo na predição dos dados experimentais. Este erro de predição deve-se principalmente ao fato de que não havia mais açúcar residual durante a fermentação de 24 horas, ou seja, terminou bem antes do previsto.

Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados obtidos nos ensaios de validação foram satisfatórios. Tais resultados mostram que a utilização do delineamento composto central promove a realização

de condições experimentais onde é possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo, estabelecendo condições que garantam as condições desejadas ao produto final.

Tabela 5.14 – Valores experimentais e preditos para as validações.

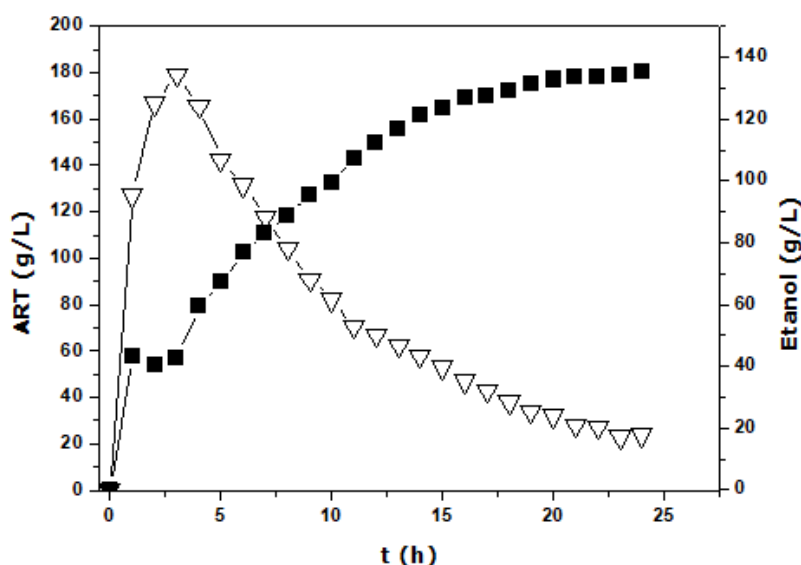
Condições	Experimental	Predito
(20°C; 260 g/L; 28%v/v)		
Y ₁ 12h (%)	76,78	69,12
Y ₂ 12h (g/L)	103,40	90,81
Y ₃ 12h (g/L.h)	8,62	7,60
Y ₄ 12h (g/L)	23,38	28,24
Y ₁ 24h (%)	85,40	78,80
Y ₂ 24h (g/L)	115,01	104,32
Y ₃ 24h (g/L.h)	4,79	4,36
Y ₄ 24h (g/L)	0,40	6,25
(27°C; 260 g/L; 28%v/v)		
Y ₁ 12h (%)	87,26	83,05
Y ₂ 12h (g/L)	117,28	116,20
Y ₃ 12h (g/L.h)	9,77	9,67
Y ₄ 12h (g/L)	0,79	1,64
Y ₁ 24h (%)	87,35	88,16
Y ₂ 24h (g/L)	117,40	117,04
Y ₃ 24h (g/L.h)	4,89	4,87
Y ₄ 24h (g/L)	0,60	0,00
(20°C; 290g/L; 28%v/v)		
Y ₁ 12h (%)	61,35	58,41
Y ₂ 12h (g/L)	91,38	85,24
Y ₃ 12h (g/L.h)	7,61	7,10
Y ₄ 12h (g/L)	67,21	66,32
Y ₁ 24h (%)	86,56	78,75
Y ₂ 24h (g/L)	128,93	116,95
Y ₃ 24h (g/L.h)	5,37	4,89
Y ₄ 24h (g/L)	2,38	9,38
(27°C; 290 g/L; 28%v/v)		
Y ₁ 12h (%)	79,93	77,20
Y ₂ 12h (g/L)	120,06	118,28
Y ₃ 12h (g/L.h)	10,0	9,86
Y ₄ 12h (g/L)	30,38	27,08
Y ₁ 24h (%)	90,30	87,44
Y ₂ 24h (g/L)	135,63	129,42
Y ₃ 24h (g/L.h)	5,65	5,39
Y ₄ 24h (g/L)	0,47	1,74
(24°C; 300 g/L; 30%v/v)		
Y ₁ 12h (%)	69,49	69,69
Y ₂ 12h (g/L)	106,92	108,56
Y ₃ 12h (g/L.h)	8,91	9,05
Y ₄ 12h (g/L)	58,09	50,56
Y ₁ 24h (%)	89,70	85,12
Y ₂ 24h (g/L)	138,02	130,56
Y ₃ 24h (g/L.h)	5,75	5,44
Y ₄ 24h (g/L)	0,19	3,75

5.3 Experimento em reator batelada alimentada

A fim de reproduzir algumas das condições obtidas pela otimização, foram realizadas duas fermentações a 24°C, com concentração inicial de ART no reator de 300 g/L, concentração celular inicial de 30%v/v e tempo de alimentação de 2h. Sendo que a 2ª fermentação foi para analisar a reutilização das células. A Figura 5.32 mostram os perfis de consumo do substrato e da produção de etanol obtidos durante o processo fermentativo para 1ª fermentação em batelada alimentada.

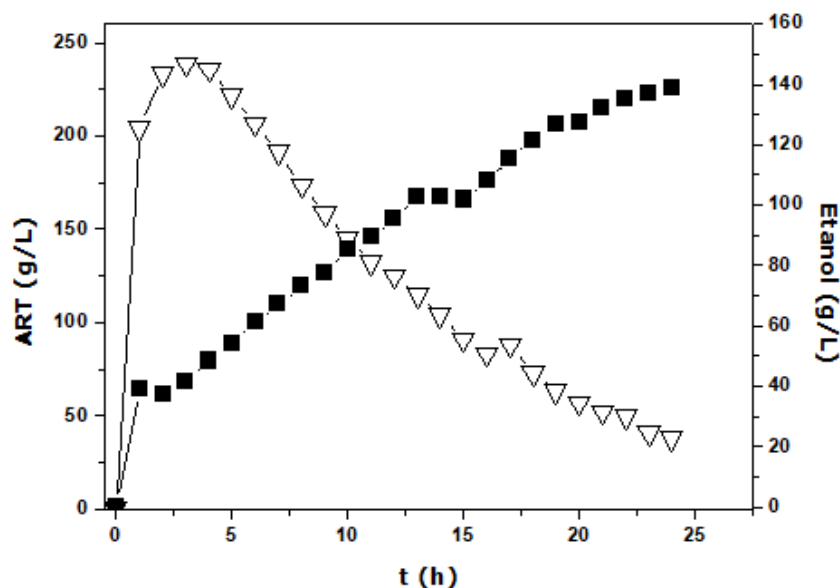
Analisando a Figura 5.32, pode-se observar que o açúcar não foi totalmente consumido no período de 24 horas de fermentação. Obteve-se um rendimento de 88,19%, produtividade de 5,63 g_{etanol}/L.h, um teor alcoólico de 17,13°GL, uma quantidade de açúcar residual de 23,94 g/L e uma viabilidade celular de 84,85%.

Figura 5.32 – Perfis de concentração de açúcares (∇) e concentração de etanol (\blacksquare) em função do tempo para a 1ª fermentação em batelada alimentada.



Reutilizando a levedura da primeira fermentação, foi realizada uma segunda fermentação nas mesmas condições experimentais da primeira, cujos resultados estão apresentados na Figura 5.33. Com 24 horas de fermentação, a concentração de açúcar residual era de 38,11 g/L, o teor alcoólico de 17,64°GL, com um rendimento de 90,78%, produtividade de 5,80 g/L.h e uma viabilidade celular de 88,18%, indicando a possibilidade de se trabalhar com maior teor de etanol no mosto e reciclagem de leveduras, já que a viabilidade se manteve elevada e relativamente constante, mesmo depois da reutilização.

Figura 5.33 – Perfis de concentração de açúcares (∇) e concentração de etanol (\blacksquare) em função do tempo para a 2ª fermentação em batelada alimentada



Ambas as fermentações foram incompletas, necessitando-se de um maior tempo de fermentação para total consumo do substrato. O tempo de fermentação ainda é elevado se comparado com os atuais tempos de fermentação obtidos em batelada alimentada nas destilarias brasileiras (6-12h). E isso pode ser devido ao tempo de enchimento adotado, já que tempos de enchimentos muito pequeno, as vazões são muito elevadas e podem provocar inibição do metabolismo das leveduras pelo acúmulo de substrato no meio em fermentação, além disso, o tempo de fermentação pode aumentar, e conseqüentemente diminuir a produtividade (VASCONCELOS e VALDMAN, 1988). Ou também, pela alta densidade celular utilizada tornando assim inapropriada o modo de operação na configuração de reator escolhida neste trabalho.

Cruz (2019) utilizando a estirpe floculante FL-20 em batelada repetida, sendo que as fermentações foram realizadas a 30°C com meio otimizado contendo 300 g/L de glicose. O tempo de fermentação foi de 47 horas ao longo de 8 ciclos. No 1º ciclo a concentração de etanol foi de 130 g/L (16,5°GL) com total consumo de glicose, produtividade 2,77g/L.h, rendimento 85,7% e viabilidade final de 86,1%..

Phukoetphim et al. (2018) empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* NP01 em fermentações VHG (290 g/L) em batelada repetida durante 5 ciclos sucessivos. Obteve-se uma concentração de etanol de 112 g/L (14,2°GL), produtividade de 1,55 g/L.h e rendimento de 86,10%.

Cerqueira (2013) utilizando a levedura PE-2 também obteve altas concentrações de etanol em seu estudo de fermentações VHG (com mostos de 25, 30 e 35°Brix). Para a

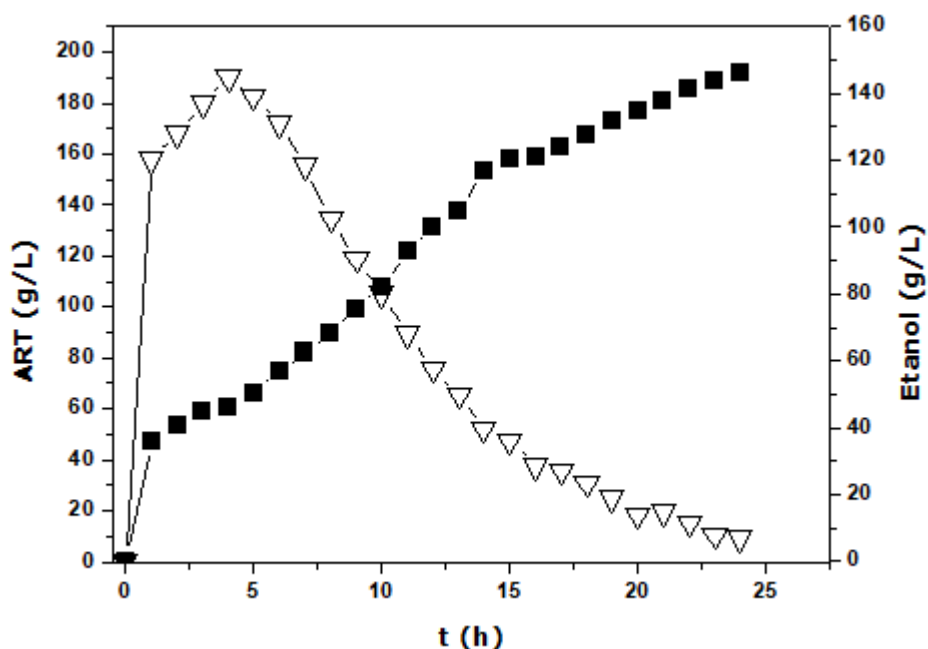
fermentação em mostos com 25° Brix, os valores de etanol obtidos foram os melhores e variaram de 9,88%(v/v) o 1° ciclo e 14,43% (v/v) no 6° ciclo.

Os resultados obtidos por Cruz (2019) foram semelhantes ao obtido por este presente trabalho, em relação a viabilidade celular (88,18%) e teor alcoólico (17,64°GL), porém a produtividade foi de 5,80 g/L.h devido ao tempo de fermentação ter sido 24 horas.

Assim, os resultados do presente trabalho apresentaram teores alcoólicos elevados quando comparados aos demais autores. E um aspecto importante a ser destacado neste trabalho é a possibilidade de reciclar a levedura mesmo com teores alcoólicos acima de 10°GL.

Com a finalidade de melhorar a condução da fermentação em VHG com altas densidades celulares, foi realizado uma fermentação a 24°C, com concentração inicial de ART no reator de 300 g/L, concentração celular inicial de 21%v/v e um tempo de alimentação de 4h. Os resultados estão apresentados na Figura 5.34.

Figura 5.34 – Perfis de concentração de açúcar residual redutor total – ART (∇) e concentração de etanol (\blacksquare) em função do tempo para a fermentação realizada em batelada alimentada com tempo de alimentação de 4h.



Analisando a Figura 5.34, num período de 24 horas de fermentação obteve-se um rendimento de 94,12%, produtividade de 6,01 g/L.h, um teor alcoólico d 18,28°GL, um açúcar residual de 9,3g/L e uma viabilidade celular de 82,76%. Pode-se observar que os resultados obtidos desta fermentação em relação as fermentações (com tempo de enchimento de 2h) foram melhores quanto ao rendimento, teor alcoólico e açúcar residual. Por outro lado,

quanto a produtividade em etanol observa-se pequena variação (5,63-5,80 g/L.h e 6,1 g/L.h) entre os dois perfis de alimentação (2h e 4h). E esses melhores resultados obtidos pelo perfil de alimentação do mosto em 4 horas, pode ser devido pelo tempo de enchimento adotado, já que segundo Martinez (2007) o tempo de enchimento influencia diretamente no rendimento de fermentação. O aumento do rendimento nos maiores tempos de alimentação é explicado pelo fato das células sofrer pouca ou nenhuma inibição pela concentração elevada de substrato.

Veloso et al. (2019) empregando a cepa Y-904 em processo batelada alimentada tipo torre a 28°C, 60 g/L de concentração celular e 305,5 g/L de concentração de substrato e tempo de alimentação de 5h, obtiveram um teor alcoólico de 17,1°GL e produtividade de 4,99 g/L.h e consumo total do açúcar, durante 28 horas de fermentação.

Cruz et al. (2018) utilizando a cepa Y-904 em processo batelada alimentada a temperatura 26°C, 35 g/L de concentração celular, uma concentração de ART inicial de 240 g/L e com tempo de alimentação de 5h, obteve um rendimento de 93%, produtividade de 6 g/L.h e um teor alcoólico de 113,6 g/L (14,40°GL) e total consumo do substrato durante 19 horas de fermentação.

Neste presente trabalho os resultados apresentados utilizando a cepa C2/00 foram promissores, já que obteve teor alcoólico e rendimento superior se comparado aos demais autores. Além disso, é possível concluir, a influência do tempo de enchimento para condições operacionais específicas na fermentação, pois notou-se que dependendo do tempo de alimentação utilizado, foram obtidos melhores rendimentos em etanol.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

No DCC a análise da influência das variáveis temperatura, concentração inicial de ART e concentração celular no reator em processo batelada (análise em 12 e 24h de fermentação) indicou uma faixa ótima para a fermentação alcoólica com melhores resultados de temperaturas entre 25-29°C, 260-310 g/L de ART inicial e 22-30% v/v de concentração celular no reator.

Os resultados das fermentações de validação dos pontos ótimos obtidos através do *Statistica*® 7.0 (superfícies de resposta e a função desejabilidade) indicaram que as equações de otimização fornecidas pelo DCC conseguiram descrever bem o comportamento do processo de fermentação, validando assim o modelo.

As fermentações em batelada alimentada, implicou em resultados promissores já que apresentaram teores alcoólicos elevados que os obtidos em fermentações convencionais.

Os valores obtidos da viabilidade e teor alcoólico no experimento de reutilização celular apresentaram valores próximos em relação a 1° e 2° fermentação, sendo que a viabilidade praticamente se manteve constante indicando a possibilidade de reutilização de células em fermentações VHG.

6.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Avaliar a eficiência da fermentação VHG em batelada alimentada com suprimento de aeração no estágio inicial da fermentação.

Estudar novas configurações de reator para o processo em VHG e alta densidade celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLBURQUERQUE, Caio (Ed.). **Resíduo da produção de etanol é matéria-prima para biogás**. 2017. Disponível em: <jornal.usp.br/?p=92875>. Acesso em: 22 abr. 2019.

AMARAL, F. S. Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

AMORIM, Henrique de Vianna de et al. Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. **Visão Agrícola**, São Paulo, n. 8, p.34-37, jun. 2008.

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

ANDRADE, R. R. "Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica." Dissertação (mestrado) Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2007.

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

AZEVEDO, M. S. DE; SANTOS, R. V. DE O.; MAGALHÃES, T. V. Produção de Etanol no Brasil. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v. 2, p. 151–154, 2012.

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

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. "Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875," *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 12, pp. 1843–1848, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>

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

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

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Biofuel production-recent developments and prospects. IntechOpen, 2011.

BERTRAND, E.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SIGOILLOT, J. C.; FAULDS, C. First generation bioethanol. In: Soccol CR, Brar SK, Faulds C, Ramos LP, eds. *Green fuels technology*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016:175–212.31
https://doi.org/10.1007/978-3-319-30205-8_8

BOSSLE, R. IEA aposta em crescimento de biocombustíveis e eletricidade limpa nos carros até 2023. 2018. <<https://www.novacana.com/n/etanol/meio-ambiente/iea-aposta-crescimento-biocombustiveis-eletricidade-limpa-carros-2023-061218>> Acesso em 21/03/2019.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production, *Bioresour. Technol.* 101, 4862-4874, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009>

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

CASTRO, Z. R. Inovações tecnológicas na agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ADMINISTRAÇÃO, 17. Paraná: v. 9, p. 1 – 12, 2017.

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

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégico. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. BNDES e CGEE – Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. 2009.

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

CNPem. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2017. Disponível em <<http://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/>> Acesso em 05/04/2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. ISSN 2318-7921 Acomp. safra bras. cana, Safra 2018/19, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, v. 5. p. 1-73, 2019.

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

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

CRUZ, M. L. Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. (Tese de Doutorado), Programa de pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2019.

CTBE. Laboratório nacional de ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2014. Disponível em <<http://ctbe.cnpem.br/fermentacao-vhg-dobro-etanol-menos-vinhaca/>> Acesso em 25/04/2019.

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

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Improving bioethanol production—comparison between extractive and low temperature fermentation. *Applied energy*, v. 98, p. 548-555, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.04.030>

DE LA TORRE-GONZÁLEZ, F. J. et al. Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *Lwt*, v. 67, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.024>

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

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

DEED, R. C.; DEED, N. K.; GARDNER, R. C. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature during wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107.4: 1029-1048, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0395-5>

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

FUKUSHIMA S. YAMADE, K.. “A novel process of ethanol production accompanied by extraction of sugar in cane chips,” *Journal of Fermentation Technology*, vol. 66, no. 4, pp. 423–426, 1988. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(88\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0385-6380(88)90009-X)

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*, Kent, v. 110, n. 1311, p. 175-181, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. O potencial para a produção de etanol de primeira geração a partir da cana-de-açúcar. Biocombustíveis, Bioprodutos e Biorefinação: Inovação para uma economia sustentável, v. 4.1, p. 17-24, 2010.

GUERRA, A. F. Métodos De Contagem Microbiana. n. 1ª Edição, p. 28, 2016.

GUIDINI, C. Z. Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes. 2013. 127 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

HIDZIR, N. S.; SOM, A. S.; ABDULLAH, Z. Ethanol production via direct hydration of ethylene: a review. In: International conference on global sustainability and chemical engineering (ICGSE). 2014.

ISONO, Y. and HOSHINO, A. Production of ethanol using granulated yeast cells prepared by a spray dryer, The Journal of General and Applied Microbiology, v. 46, n°. 4, p. 231–234, 2000. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.231>

JOHN, G. S. M. et al. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 100–105, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0036-9>

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

KASEMETS, K.; NISAMEDTINOV, I.; LAHT, T. M.; ABNER, K. AND PAALME, T.. Growth characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* S288C in changing environmental conditions: auxoaccelerostat study, Antonie van Leeuwenhoek, v. 92, n°. 1, p. 109–128, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9141-y>

LABOR SHOPPING. **Camara de newbauer melhorada e espelhada**. Disponível em: <<http://laborshopping.com.br/produto/camara-de-new-bauer-melhorada-e-espelhada/3333>>. Acesso em 04/05/2019.

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

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

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

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

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

MA, K.; WAKISAKA, M.; SAKAI, K.; SHIRAI, Y. Flocculation characteristics of an isolated mutant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain and its application for fuel ethanol production from kitchen refuse. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2289–2292, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.010>

MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A., and KANELAKI, M.. “Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures: effect of immobilization and temperature on volatile by-products,” *Food Chemistry*, vol. 80, no. 1, pp. 109–113, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00247-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00247-9)

MARTINEZ, D.S. Estudo dos processos industriais de produção de etanol por fermentação. 2007. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química / Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MORAES, M. A. F. D.; OLIVEIRA, F. C. R.; DIAZ-CHAVEZ, R. A. Socio-economic impacts of Brazilian sugarcane industry. *Environmental development*, v. 16, p. 31–43, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.06.010>

MANOCHIO, C. Produção de Bioetanol de cana-de-açúcar, milho e beterraba: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos. 2014. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas - Campus Poços de Caldas. Poços de Caldas, 2014.

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

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v.28, p.817–830, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>

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

MME - Conheça o processo de análise que antecedeu o aumento do etanol anidro na gasolina <http://www.mme.gov.br/web/guest/pagina-inicial/manchete/_asset_publisher/neRB8QmDsbU0/con.tent/conheca-o-processo-de-analise-que-antecedeu-o-aumento-do-etanol-anidro-na-gasolina> 2015. Acesso 29/05/2019.

NOVACANA. Sobre o Etanol. 2013 <<https://www.novacana.com/etanol/sobre-etanol>> Acesso em 20/03/2019.

NOVACANA. Funcionamento de uma usina (Destilaria) de etanol, 2013. Disponível em <<https://www.novacana.com/etanol/funcionamento-usina-destilaria>> Acesso em 20/03/2019.

NOVACANA. IEA aposta em crescimento de biocombustíveis e eletricidade limpa nos carros até 2023, 2018. < <https://www.novacana.com/n/etanol/meio-ambiente/iea-aposta-crescimento-biocombustiveis-eletricidade-limpa-carros-2023-061218>> Acesso em 21/03/2019.

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

PATRASCU, E.; RAPEANU, G.; HOPULELE, T. Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol. *Innovative Romanian Food Biotechnol.* v. 4, p.1–11, 2009.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentation 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>

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; and TANTHAPANICHAKOON, W..“Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 28, no. 1, pp. 36–43, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.039>

PHUKOETPHIM, N. et al. A novel aeration strategy in repeated-batch fermentation for efficient ethanol production from sweet sorghum juice. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 26 nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.11.010>

PIMENTA, C. D.; SILVA, M. B.; SALOMON, V. A. P.; PENTEADO, R. B.; GOMES, F. M. Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperados. *Production – UNESP/Guaratinguetá*, v. 1, p. 1-13, 2014.

PIRSELOVA, K.; Smogrovićova, D. and Balaz, S.. “Fermentation of starch to ethanol by a co-culture of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*,” *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 9, no. 3, pp. 338–341, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00383075>

PULS, M. As boas-novas da cana-de-açúcar Além dos benefícios ambientais, o aumento da produção de etanol ajudou a melhorar os indicadores sociais no campo. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/01/12/as-boas-novas-da-cana-de-acucar/>>.

PULIGUNDLA, P.; SMORGROVICOVA, D.; OBULAN, V.S.R.; KO, S. Very high gravity ethanolic brewing and fermentation: a research update. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.38, p.1133-1144, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0999-3>

PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Applied And Environmental Soil Science*, Hindawi Limited [s.l.], v. 2013, p.1-8, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>.

RIVERA, E. C.; YAMAKAWA, C. K.; SAAD, M. B. W.; ATALA, D. I. P.; AMBROSIO, W. B.; BONOMI, A.; JUNIOR, J. N.; 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>

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

SANTOS, J. et al. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, v. 154, n. 2, p. 422–430, 2008. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011445-0>

SANTOS, L. D. fermentação alcoólica empregando leveduras floculantes em sistema de reatores torre. (Tese de Doutorado), Programa de pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2014.

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

TONOLI, F. C. Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, v. Universidade, n. Piracicaba, 2017.

VASCONCELOS, J.N. VALDMAN, B. Otimização do Processo de Fermentação Alcoólica através da Batelada Alimentada. V Simpósio de Avaliação de Safra da Agroindústria da Cana-de-Açúcar em Alagoas. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, v.106, no 2, 38-48, 1988.

VASCONCELOS, Y. Fermentação Vantajosa: Uso de novas linhagens de levedura pode reduzir custo de produção das usinas de açúcar e álcool. *Tecnologia, Pesquisa da Fapesp*, v. 135, n. 1, p.67-70, 2007.

VELOSO, I. I.; RODRIGUES, K. C.; SONEGO, J. L.; CRUZ, A. J.; BADINO, A. C. Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization. *Biochemical Engineering Journal*, v. 141, p. 60-70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.10.005>

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

WANG M, HAN J, DUNN JB, CAI H, ELGOWAINY A. Well-to wheelsenergy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. *Environ Res Lett.* 2012. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/7/4/045905>

WATANABE, D. et al. Promoter engineering of the *Saccharomyces cerevisiae* RIM15 gene for improvement of alcoholic fermentation rates under stress conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 123, n. 2, p. 183–189, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.08.004>

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>