UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TERESA CRISTINA VIEIRA VIANA

Estudo de levedura rugosa na produção de bioetanol

Pirassununga
2019

TERESA CRISTINA VIEIRA VIANA

Estudo de levedura rugosa na produção de bioetanol

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Gestão e Inovação na Indústria Animal.

Área de Concentração: Gestão e Inovação na Indústria Animal

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

Pirassununga
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

V614e

Viana, Teresa Cristina Vieira
Estudo da levedura rugosa na produção de bioetanol / Teresa Cristina Vieira Viana –- Pirassununga, 2019.
59 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Gestão e Inovação na Indústria Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura.

1. Levedura Lisa 2. Levedura Desestressada 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. Etanol 5. Fermentação. I. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor”

Dedicatória

Aos meus pais que me ensinaram valores éticos e morais, e princípios para a vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por sempre ter me dado ânimo de levar este intento adiante.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Eliana Setsuko Kamimura, por toda a paciência, carinho, dedicação, empenho e principalmente ao seu tempo dedicado nos finais de semana e até mesmo domingo à noite. Gratidão Eterna! Muito obrigada por nunca me desmotivar.

Agradeço ao meu querido neto, Guilherme, que me ajudou na adaptação de algumas figuras.

Ao meu filho Pablo que coordenou o time do laboratório da Microserv Biotecnologia Ltda na elaboração dos resultados analíticos.

Por último, quero agradecer ao meu esposo Luiz Carlos por ter estado presente em todos os momentos desta caminhada.

“O papel do infinitamente pequeno é infinitamente grande”
Louis Pasteur

RESUMO

VIANA, T. C. V. **Estudo de levedura rugosa para produção de etanol**, 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Gestão e Inovação na indústria animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

A cada vez mais competitiva a indústria de bioetanol está sempre em busca de melhorar e inovar as eficiências e rendimentos da produção, desta forma investigações de pequenos detalhes que fazem a diferença no processo produtivo, proporcionando aumento de litros por tonelada de cana de açúcar. Neste sentido o objetivo deste estudo foi a avaliação de um fenômeno recorrente em quase todas as fermentações etanólicas do Brasil sobre as leveduras rugosas (LR). Este tipo de levedura provoca redução da produção de etanol pelo simples fato de que as leveduras lisas (LL) inoculadas no início do processo de fermentação terem se estressado pela ação de altas temperaturas, em razão de não ser dada a devida atenção à refrigeração das dornas. Os resultados deste estudo e nas usinas mostraram que as leveduras, depois de se estressarem, diminuem a capacidade de produzir etanol com a mesma capacidade de conversão do início do processo quando estavam desestressadas, leveduras lisas (LL). Nas leveduras estressadas, que são as rugosas (LR), as células filhas não se soltam das células mãe e a área de contato diminui, ocasionando menor produção de etanol a partir de substrato padrão. A levedura do processo transformada (LPT), da empresa Microserv Biotecnologia, foi obtida de um processo que transforma as leveduras rugosas em lisas novamente. Dessa forma, primeiramente num estudo em escala laboratorial, comparou-se a EF (eficiência de fermentação) variando-se as proporções de leveduras LR e LPT com concentração de açúcar redutor inicial (ART_i). Por meio de um planejamento fatorial 2^2, obteve-se um ganho de 6,86% de EF com a levedura LPT e 20% de ART_i. Foi feita a validação pelo teste de Tukey da diferença de médias da EF comparando as três leveduras LL, LR e LPT fermentadas com 15% de ART_i e não houve diferença estatística a $p \leq 0,05$ na média da EF da LL e da LPT. Ressalta-se que a LL só se mantém no processo no início da safra. E para avaliar se a LPT se manteria estável em toda a safra, foi proposto um estudo da LPT em escala industrial em usina na região de Pirassununga/SP durante toda a safra de 2018 e de abril até setembro da safra de 2019. A LPT foi inoculada nas dornas de fermentação no início das safras de 2018 e 2019 e, mesmo em temperaturas mais altas, manteve-se em boa concentração até o final da safra mostrando resistência a altas temperaturas. Comparando-se os resultados de EF da safra de 2017, que não utilizou a levedura LPT, com as safras estudadas de 2018 e 2019 com a LPT, pode se observar que as duas últimas safras apresentaram acréscimos de EF de 3,92% e 4,36%, respectivamente, segundo dados industriais. O impacto dos resultados obtidos foi a maior produção de bioetanol com os mesmos insumos, equipamentos e infraestrutura física da Usina. Tomando-se como referência esta unidade industrial estudada, que produz em média 100 milhões de litros por safra, aumentar-se-á a produção em torno de quatro milhões de litros somente pela ação da levedura.

Palavras-chave: Levedura lisa. Levedura rugosa. Levedura do processo transformada. *Saccharomyces cerevisiae.* Bioetanol. Fermentação submersa.

ABSTRACT

VIANA, T. C. V. **Study of rough yeast for ethanol production**, 2019. 59 f. Dissertation (Master in Management and Innovation in the Animal Industry) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The increasingly competitive bioethanol industry is always seeking to improve and innovate efficiency and production yield. In this way, the study of the small details that make all difference in the production carrying out in increase of litres of bioethanol per ton of sugar cane. The aim of this study about rough yeast (RY) that occured like a phenomenon which is widespread in almost of the bioethanol fermentation in Brazil. YR is a type of yeast, can cause a reduction in the bioethanol production due to the fact that plain or smooth yeast (SY) inoculated in the fermentation has been stressed by the action of high temperatures, due to not being given due attention to refrigeration system. By the results of fermentation efficiency (FE) in industry or in this study, when stressed smooth yeasts decrease their ability to produce ethanol with the same conversion capacity as the beginning of the process when they were de-stressed, smooth yeasts (SL). In stressed yeasts, which are the rough ones (RY), the daughter cells do not detach from the mother cells and the contact area decreases, causing lower ethanol production from standard substrate. The yeast from transformed process (PTY), from Microserv Biotecnologia, was obtained from a process that turns rough yeasts (RY) into smooth or plain yeasts again (SY). Thus, in laboratory-scale in this study, the fermentation efficiency (FE) was compared by varying the proportions of LR and PTY yeasts with initial reducing sugar concentration (ARTi). By using a 2^2 factorial design, a gain of 6.86% FE using PTY yeast and 20% ARTi. The Tukey test validated the FE mean difference comparing the three SY, RY and PTY yeasts in fermentation with 15% ARTi and there was no statistical difference at $p \leq 0.05$ in the mean SY and PTY in EF. It is noteworthy that SY only remains in the process at the beginning of the harvest. Moreover, to assess whether PTY would remain stable throughout the harvest, an industrial-scale PTY study was proposed at a bioethanol industry in the Pirassununga/SP region throughout the 2018 harvest and from April through September of the 2019 harvest. PTY was inoculated in fermentation in the beginning of harvest 2018 and 2019. It was observed that, even at higher temperatures in fermentation, the PTY remained in good concentration until the end of the harvest showing resistance to high temperatures. Comparing the process results (FE) of the harvest that did not use the PTY (2017) with the following harvests (2018 and 2019), they presented FE increases about 3.92% and 4.36%, respectively, according to industrial data. The impact of this result is the higher production of bioethanol with the same inputs, equipment and physical infrastructure as the industrial plant. Taking as a reference an industrial unit studied that produces on average 100 million liters per harvest, the production will increase around four million liters only by the action of PTY.

Key words: Smooth yeast. Snowflake yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. Bioethanol. Submerse fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma com as principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol 15

Figura 2 - Esquema simplificado do processo Batelada de fermentação.....17

Figura 3 - Fluxograma simplificado do processo de fermentação contínua para produção de álcool.....18

Figura 4- Aspecto das leveduras(A) leveduras com células livres e não floculadas e (B) leveduras com células agrupadas em cachos, floculadas.....20

Figura 5 - Esquema ilustrativo da teoria de floculação de leveduras.....21

Figura 6 - Comparação entre a produtividade e produção de etanol por leveduras lisas e rugosas (A) Produtividade média(g/l.h);(B)Produção de etanol (g/100mL) e (C)Produção de etanol(g/100 mL)até 48h.. 23

Figura 7 - (A) Colônia lisa, (B) Células soltas que formam a colônia lisa, (C) Colônia Rugosa e (D) Pseudohifas, células que brotaram e não se soltaram. .26

Figura 8 - Esquema bidimensional da morfologia do crescimento das leveduras rugosas, mostrando uma formação celular-ocular desfigurada.Início: Imagem confocal tridimensional de um aglomerado de levedura rugosa. 28

Figura 9 - Mudanças ao longo de 7 semanas de evolução experimental em valores médios de tamanho do aglomerado de levedura, proporção do aspecto celular e fração volumétrica do aglomerado. 29

Figura 10 - Simulação geométrica do crescimento do aglomerado.....30

Figura 11 - Colônia de levedura rugosa de usina em estudo.....32

Figura 12 - Tubo Falcon para a coleta das amostras da fermentação.....35

Figura 13- Nuances da levedura rugosa (LR) em forma de flor e a redonda que é a LPT que antes tinha formato de flor.....37

Figura 14 - Isolamento de levedura em meio WLN.....38

Figura 15 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados padronizados do fatorial 2^2 para produção de etanol (%).....41

Figura 16 - Superfície resposta e curva de contorno para a produção de etanol.....44

Figura 17 - Fluxograma da fermentação de uma fermentação industrial da usina x 48

Figura 18 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de abril a junho de 2018.....49

Figura 19 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de setembro de 2018.....49

Figura 20 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de agosto a outubro de 2018.....50

Figura 21 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de outubro a dezembro de 2019.....50

Figura 22 - Porcentagem de predominância safra 2018/2019.....51

Figura 23 - Fenótipos da levedura do processo industrial da usina ondw as fotografias ao microscópio foram tiradas com aumento de 400x.....53

Figura 24 – Aspectos das colônias de leveduras do processo trnasformada (LPT) e leverugosas (LR) em meio de cultura WLN. 54

Figura 25 - Placa de Petri com leveduras 100% lisas (meio de cultivo WLN aonde mostra levedura 100% lisas (aspecto igual LPT), em meio WLN da usina em pesquisa 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Nível codificado e real das concentrações de leveduras e sacarose no delineamento fatorial 2^2 para a produção de etanol.....33

Tabela 2 - Mosto com as concentrações de sacarose (ART) e concentrações de LPT e LR para o preparo de todos os ensaios do fatorial 2^2 para a produção de etanol.....34

Tabela 3- Delineamento fatorial completo para produção de etanol utilizando leveduras LPT e rugosas.....39

Tabela 4 - Efeitos principais e de interação na produção de etanol.....41

Tabela 5 - Coeficientes de regressão do fatorial 2^2 para a avaliação da produção de etanol(%).....42

Tabela 6 - ANOVA para o fatorial 2^2 para a produção de etanol-modelo completo.....43

Tabela 7 - ANOVA para o fatorial 2^2 para a produção de etanol-modelo reduzido.....43

Tabela 8 - Valores das triplicatas para cada tipo de levedura e as respostas açúcar redutor total (ART), AS (ácido succínico) e ácido láctico (AL) 46

Tabela 9 - Valores das triplicatas para cada tipo de levedura e as respostas glicerol (%) ácido acético (AA) em ppm e % etanol.....46

Tabela 10 - Acompanhamento da porcentagem de leveduras lisas e rugosas ao longo da safra.....52

Tabela 11 - Resultados comparativos de eficiência de fermentação..... 55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....12

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

2.1 Produção de bioetanol no Brasil 14

2.2 Esquema de produção de etanol no Brasil 16

2.3 Bioquímica da fermentação etanólica.....18

2.4 Diferenças entre levedura rugosa e floculante.....20

2.5 Levedura rugosa na fermentação etanólica.....22

3 OBJETIVO 31

3.1 Objetivo geral.....31

3.2 Objetivos específicos 31

4 MATERIAL E MÉTODOS 32

4.1 Levedura Rugosa (LR) e Levedura (LPT) utilizadas na pesquisa.....32

4.2 Comparação de produção em escala laboratorial.....34

4.3 Obtenção da massa celular das leveduras LR e LPT para os testes fermentativos do Fatorial de 2^2 34

4.4 Validação da melhor condição do fatorial 2^2 para a produção de Etanol.....35

4.5 Obtenção das amostras de fermento para acompanhamento da Fermentação no processo industrial 35

4.6 Métodos analíticos.....36

4.6.1 Cromatografia líquida de alta efciência.....36

4.6.2 Contagem das colônias das leveduras para porcentagem de lisas e Rugosas.....36

4.6.3 Isolamento das leveduras para obtenção de massa celular.....37

4.7 Análise estatística.....39

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....39

5.1 Planejamento fatorial 2^2 para avaliar a produção de bioetanol.....39

5.1.1 Análise do planejamento experimental- fatorial completo 2^2.....40

5.2 Validação de métodos com as diferentes leveduras para a produção de etanol (%).....45

5.3 Aplicação de levedura rugosa desestressada (LPT) para a fermentação em escala industrial.....47

7 CONCLUSÃO.....55

8 REFERÊNCIAS 57

1 INTRODUÇÃO

A produção do combustível limpo sustentável vem ganhando um lugar de melhor destaque na cadeia energética visto agora o apelo mundial, de uma atmosfera sem emissão de poluentes fósseis. O Brasil foi o primeiro país do mundo a desenvolver um programa de combustível alternativo em substituição à gasolina, o programa nacional do álcool (Proálcool), que surgiu em meados da década de 1970 em meio à crise do petróleo. O Brasil também é o maior produtor mundial de aguardente e atualmente é o segundo em etanol. O etanol é o biocombustível mais utilizado e produzido no Brasil, tendo como matéria-prima a cana-de-açúcar, mas teve seu consumo incentivado, principalmente, no início dos anos 2000, com o lançamento dos motores *FlexFuel.* O Proálcool trouxe também a obrigatoriedade da adição de bioetanol na gasolina, e desde 2015, o percentual obrigatório de etanol anidro combustível na gasolina comum passou a ser de 27%, segundo portaria n. 75 do (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) (AMORIM, 2005; BRASIL, 2015).

Como toda a produção de bioetanol ocorre por via fermentativa, é fundamental o conhecimento do processo de fermentação alcoólica (KOHLHEPP, 2010; OLIVÉRIO, 2008). Existem muitos estudos feitos do processo de produção desse biocombustível, com o objetivo de melhorar cada vez mais sua eficiência. As leveduras são os microrganismos responsáveis pela produção de bioetanol. A levedura tem que competir com populações de bactérias e leveduras selvagens pelo substrato dentro do processo na indústria, essa dinâmica afeta seu desempenho negativamente. Além disso, o aumento da temperatura, consumo de açúcar, queda de viabilidade celular das células de levedura devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento; que acarreta perda de células de levedura pelo fundo de dorna ou na centrífuga; estão entre as maiores preocupações das empresas produtoras de etanol, pois interferem no rendimento industrial da produção (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Dentre os problemas citados, um que afeta de forma significativa o rendimento da produção industrial de etanol é a contaminação por leveduras selvagens. Em uma fermentação que apresentava esses problemas de processo, observou-se um biótipo de levedura com células dispostas em cadeia, apresentando colônias opacas, superfície crespa, sendo pertencente a espécie *Saccharomyces cerevisiae,* e denominadas de leveduras rugosas. Esse biótipo apresentou características como alto crescimento,

permanecendo na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma grossa, viscosa, causando extravasamento de mosto das dornas e consequentemente perda de açúcar e etanol (REIS, 2011). Este biótipo de levedura é normalmente denominado de leveduras selvagens e são as leveduras rugosas (LR) que foram comparadas neste estudo com as leveduras do processo transformada (LPT). A conversão de leveduras rugosas (LR) em leveduras do processo transformadas de rugosas para lisas em laboratório (LPT) pela empresa Microserv Biotecnologia, que permite aumentar a produção de etanol.

Um problema desafiador que surge nesta área é a integração da pesquisa científica com o que acontece nas indústrias, na prática. Na literatura consultada não foi encontradas pesquisas usando a abordagem que as leveduras rugosas são decorrentes estritamente do estresse térmico. Porém, extrapolando para a prática, foi percebido que não se tem um controle rígido da temperatura nas dornas de fermentação, portanto deveria ter um investimento maior no sistema de refrigeração das dornas para manutenção da temperatura ideal para as leveduras.

Esta constatação do comportamento das leveduras rugosas no processo de fermentação etanólica foi observado pela experiência industrial durante 32 anos pela autora desta dissertação. Na safra de cada usina as leveduras iniciam a fermentação com células soltas e ao longo dos meses, sendo que algumas usinas até aos 30 dias, ocorre dos brotos das leveduras já não se soltarem mais, por uma questão de sobrevivência. Já se contabiliza 20% de células rugosas e 80% lisas e há usinas que chegam a 50% de rugosas no primeiro mês e 100% no segundo mês.

Diante do exposto, o estudo visa entender e mostrar comparando os resultados com temperaturas acima de 33 graus nas leveduras, consequentemente na fermentação e o quanto as indústrias perdem com isso na eficiência de fermentação. Sendo assim, este estudo avaliou a produção de bioetanol comparando leveduras rugosas (LR), com as leveduras do processo transformadas de rugosas para lisas em laboratório (LPT) numa escala laboratorial e industrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de bioetanol no Brasil

O 3º Levantamento da Safra 2018/2019 de cana-de-açúcar divulgado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) revela que o país terá novo recorde na produção total de etanol, que chegou a 32,3 bilhões de litros, um aumento de 18,6% em relação à safra passada. O último maior número havia ocorrido na safra 2015/16, com 30,5 bilhões. O recorde vale também para a quantidade produzida de etanol hidratado, cerca de 21,6 bilhões, superior ao de 19,6 bi na safra 10/11 (CONAB, 2019). A produção total de etanol, proveniente da cana-de-açúcar e do milho, é de 35,5 bilhões de litros, com um acréscimo de 7,2%, comparado à safra 2018/19. Só da extração da cana são 33,8 bilhões de litros e crescimento de 4,6%. Desse total, a maior parte vai para o etanol hidratado, gerando 23,6 bilhões de litros, enquanto que o anidro fica com 10,2 bilhões. Por sua vez, o etanol do milho está despertando o interesse dos produtores. A estimativa é de uma produção de 1,69 bilhão de litros, com elevação de 114% frente a última safra, ou seja, 2017/18. O biocombustível na forma hidratada sinaliza a produção 1,2 bilhões de litros, com crescimento de 120%, ao passo que o anidro chega a 463 milhões e aumento de 2,6% a mais que no estudo anterior, (CONAB 2019).

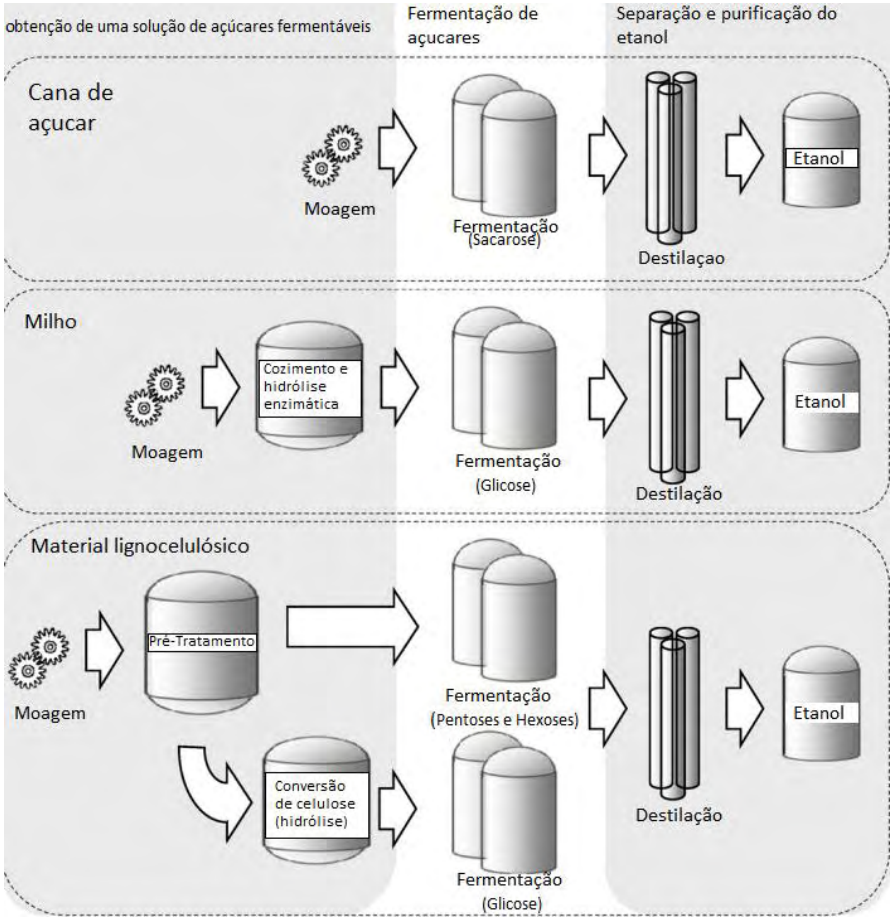
O bioetanol é um biocombustível atraente com potencial para segurança energética e segurança ambiental sobre combustíveis fósseis. Até hoje, vários recursos de biomassa foram investigados para a produção de bioetanol, que pode ser amplamente classificados em açúcares, amido, biomassa lignocelulósica e microalgas, que são os três tipos da matéria-prima para sua fabricação, ou seja, o etanol de primeira (1G), segunda (2G) e terceira geração (3G).

Para a fabricação do bioetanol 1G a matéria-prima é a cana-de-açúcar onde se se utiliza o caldo da cana e o melaço. O caldo de cana é um meio de cultivo fermentescível ideal para as leveduras contendo todos os nutrientes necessários. Já o melaço que é o resíduo da fabricação de açúcar é mais concentrado em sais minerais e contém menos nitrogênio.

Para o etanol 2G é utilizado o material que antes era considerado resíduos da agroindústria, por exemplo bagaço da cana, que também pode ser convertido

em bioetanol por processo de hidrólise primeiramente. O bagaço de cana-de-açúcar é amplamente utilizado para geração de vapor na usina e para co-geração de energia, e agora também com valor agregado para etanol 2G. Além do bagaço de cana-de-açúcar, é possível usar outros resíduos lignocelulósicos da agroindústria para a produção do etanol 2G, como palha de trigo, arroz, etc. O processo de conversão de biomassa vem sendo melhorado, embora a maioria desses processos ainda não tenha instalação comercial. Todas as principais etapas de um processo típico de conversão, particularmente a fermentação de açúcares que é o passo comum para toda a biomassa e são grandemente influenciados por microrganismos (MUSSATTO, 2010). A Figura 1 apresenta um fluxograma de produção de bioetanol utilizando exemplo de 3 tipos de carboidratos: o primeiro considerado carboidrato simples - fermentescível - caldo de cana-de-açucar, o segundo tipo substrato resistente, que necessita de processo de hidrólise - o amido de milho e o terceiro tipo de substrato mais resistente que é o proveniente de resíduos lignocelulósicos.

Figura 1 Fluxograma com as principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol.



Fonte: Modificado de Musssato et al, 2010.

Já o bioetanol 3G é fabricado a partir de microalgas marinhas . A partir da hidrólise enzimática das algas, de onde se obtém os açúcares redutores, a levedura utilizada é a comum para todas as fermentações etanólicas, a *Saccharomyces cerevisi*ae (MAGRO, 2016).

2.2 Esquema de produção de etanol no Brasil

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação etanólica. No Brasil o que está mais se utilizando a condução da fermentação contínua, batelada e com recirculação do fermento (PACHECO, 2010).

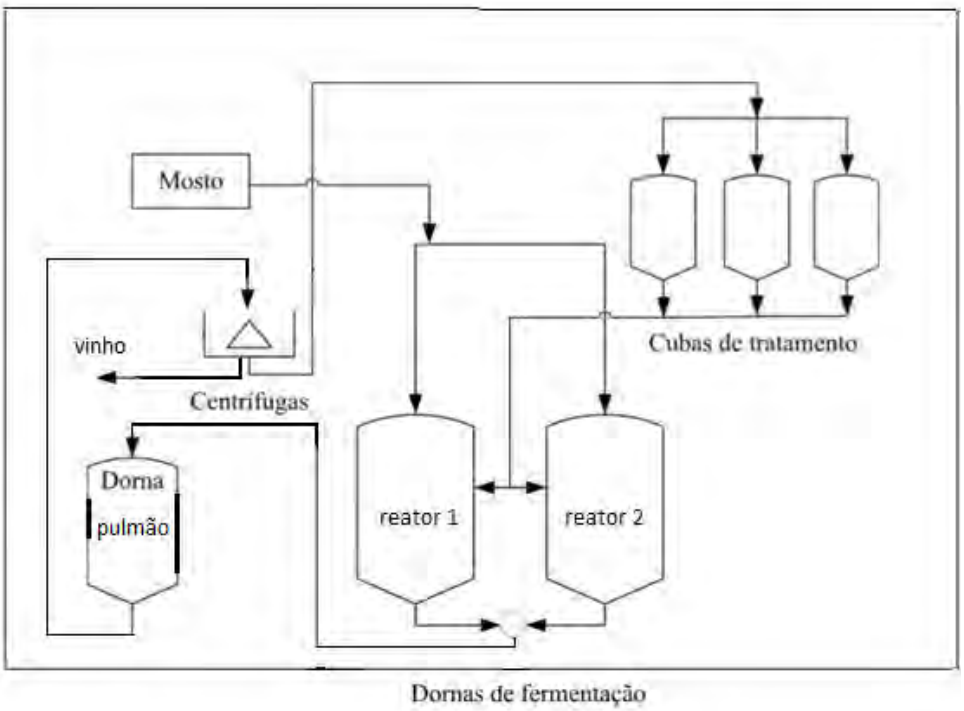
A fermentação alcoólica ocorre nas dornas de fermentação para a produção de álcool. Este processo fermentativo é realizado quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto de caldo-de-cana ou de melaço devidamente preparado e se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após cinco a seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do etanol. A acidez eleva-se com a produção do ácido succínico, abaixando o pH. Essa fase termina quando a espuma desaparece, durando de 9 a 10 horas, Antonini (2004). A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico onde diminui a formação de espuma. Essa fase dura de 6 a 8 horas e deve permanecer o mínimo possível para separar a levedura do vinho que contém o etanol produzido para evitar a infecção deste e do inóculo, comumente chamado pé-de-cuba (massa celular de leveduras em torno de 25% de concentração e que atinge 35% do volume do tanque de fermentação), onde será utilizado em nova fermentação. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho (ANTONINI, 2004).

A Figura 2 mostra a fermentação em batelada, onde processo é mais lento que a contínua, com um inóculo (levedura) por tanque e com recirculação de células, ou seja, usando como inóculo o microrganismo da batelada anterior. Cada tanque (dorna) recebe o fermento que veio da cuba de tratamento e logo após recebe o mosto.

O mosto é a solução de substrato e nutriente que contém os açúcares fermentescíveis que serão convertidos em etanol, sustentando o crescimento celular. A água é adicionada para eliminar o poder tampão da mistura, diminuir a concentração de compostos que inibem o microrganismo, tais como o etanol, e também se adiciona oxigênio ao meio por meio de aeração. Usualmente também é adicionado ao fermento o ácido sulfúrico (concentrado, 98%) para ajustar o pH do meio entre 2 e 2,5, de forma a diminuir a proliferação de bactérias (PATERNINA, 2011). Quando todo o volume da dorna, que são os tanques de fermentação, é preenchido pelo substrato, aguarda um tempo para que as leveduras consumam todo o açúcar.

Na prática, para que se conheça este ponto, mede-se a porcentagem de sólidos solúveis (ºbrix). As leveduras são separadas nas centrífugas que são máquinas com pratos justapostos e perfurados em alta rotação. Após a massa de levedura ser separada é adicionado em torno de 20% de água tratada (proveniente da estação de tratamento d'água) e após passar pelo tratamento ácido retorna para uma nova fermentação.

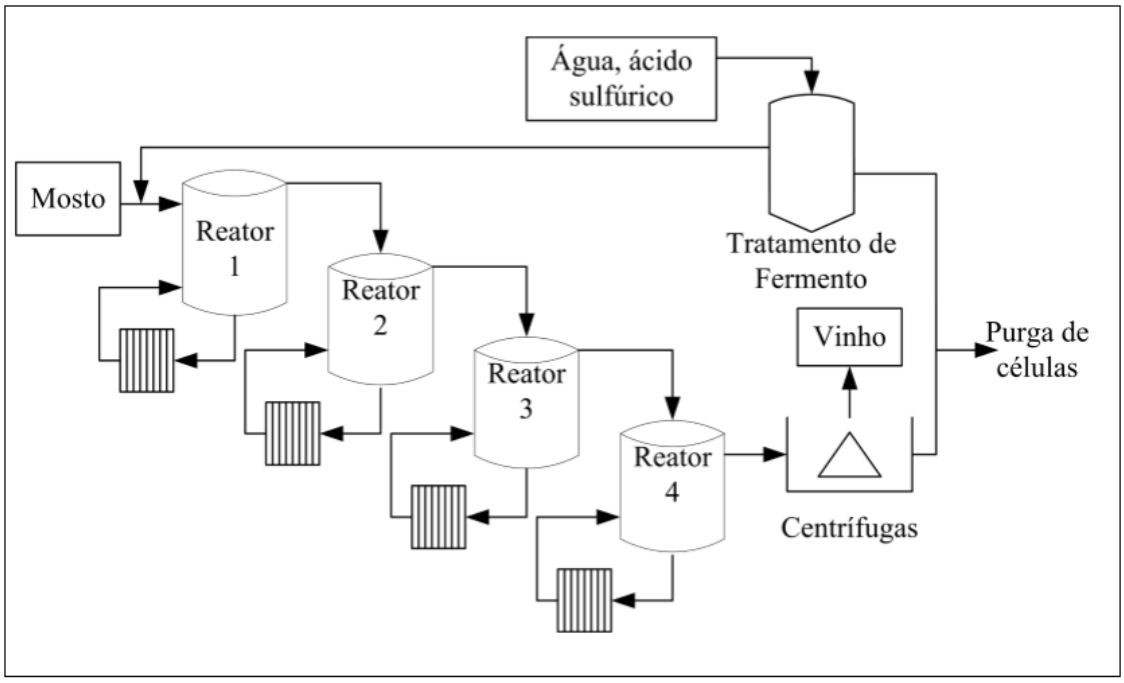
O vinho, proveniente das dornas de fermentação, após passar pelas centrífugas e que praticamente se encontra sem fermento (em torno de 0,5%) é enviado para as colunas de destilação e assim ser retirada a água e ser produzido o bioetanol. Figura 2 - Esquema simplificado do processo batelada de fermentação etanólica



Fonte: Adaptado de Pacheco, 2010.

Na Figura 3, fermentação contínua, o fermento sai da cuba de tratamento e se junta ao mosto e é enviado para o reator 1. A cuba de tratamento é um tanque cilíndrico onde se adiciona água e ácido sulfúrico, que por exemplo pode variar de 25 a 500m^3, a depender da capacidade de produção de etanol. A função da água é lavar o fermento e a função do ácido é desflocular e agir como antibacteriano. Com a vazão de mosto aumentando vai havendo transbordamento de um reator para o outro sucessivamente e quando chega no reator 4 todo o açúcar redutor total (ART) já foi transformado em etanol. Daí é bombeado para as centrífugas, onde o fermento é separado do vinho. O vinho contendo etanol vai ser destilado e o fermento retorna para a cuba de tratamento numa concentração de entre 70-80% (PACHECO 2010).

Figura 3 - Fluxograma simplificado do processo de fermentação contínua para produção de álcool



Fonte: Adaptado de Pacheco, 2010.

2.3 Bioquímica da fermentação etanólica

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As mais utilizadas na produção de etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, variando de 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula mãe, e após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula. A levedura realiza a

fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. A célula de levedura possui compartimentos para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração), se dá na mitocôndria (AMORIM et al., 2005).

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro denominado glicólise tem a função de "quebrar" a molécula de glicose até ácido pirúvico, por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um o balanço desta etapa. Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde este será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água. O balanço global dos dois ciclos pode ser resumido pela equação de Gay Lussac: A reação global da glicólise (Equação 1), demonstra que 1 mol de glicose (180g) produz 2 moles de etanol (92g), 2 moles de dióxido de carbono (88g) e 57 kcal de energia. Assim, o rendimento teórico (Yp/s) para a produção de etanol é de 0,511 g/g, ou seja, cada grama de sacarose produz 0,511g de etanol (Equação 2).

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \xrightarrow{Invertase} \underset{D-glicose}{C_6H_{12}O_6} + \underset{D-frutose}{C_6H_{12}O_6} \qquad \text{Eq 1}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ Pi + 2\ ADP \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP + 2\ H_2O + 57\ kcal \qquad \text{Eq 2}$$

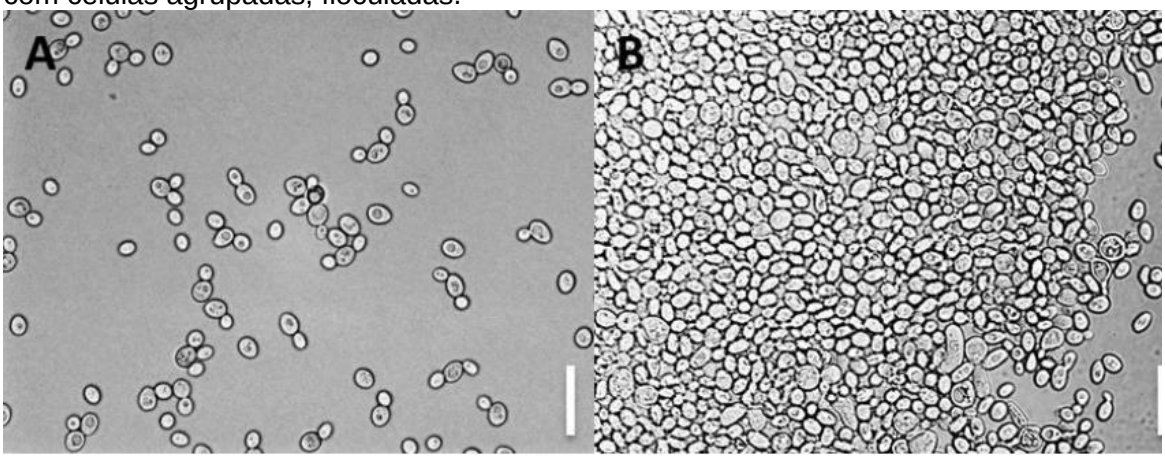
Na prática este valor não é observado devido à utilização de parte da glicose para produção de glicerol e álcoois superiores, síntese de material celular e manutenção da levedura. Assim, frente ao número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes, concentração de micronutrientes, etc., afetam os

parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol (SOUZA, 2009).

2.4 Diferenças entre levedura rugosa e floculante

Existe uma controvérsia a respeito do termo levedura rugosa e levedura floculante, e a Figura 4 apresenta as diferenças entre elas. Em alguns estudos esses dois termos são usados como sinônimos, mas se trata de conceitos diferentes. A floculação é a agregação de células de leveduras em massas multicelulares, compostas por centenas e até milhares de células, chamadas de flocos, que resulta na rápida sedimentação celular (SOARES, 2011).

Figura 4- Aspecto das leveduras (A) com células livres e não floculadas e (B) leveduras com células agrupadas, floculadas.

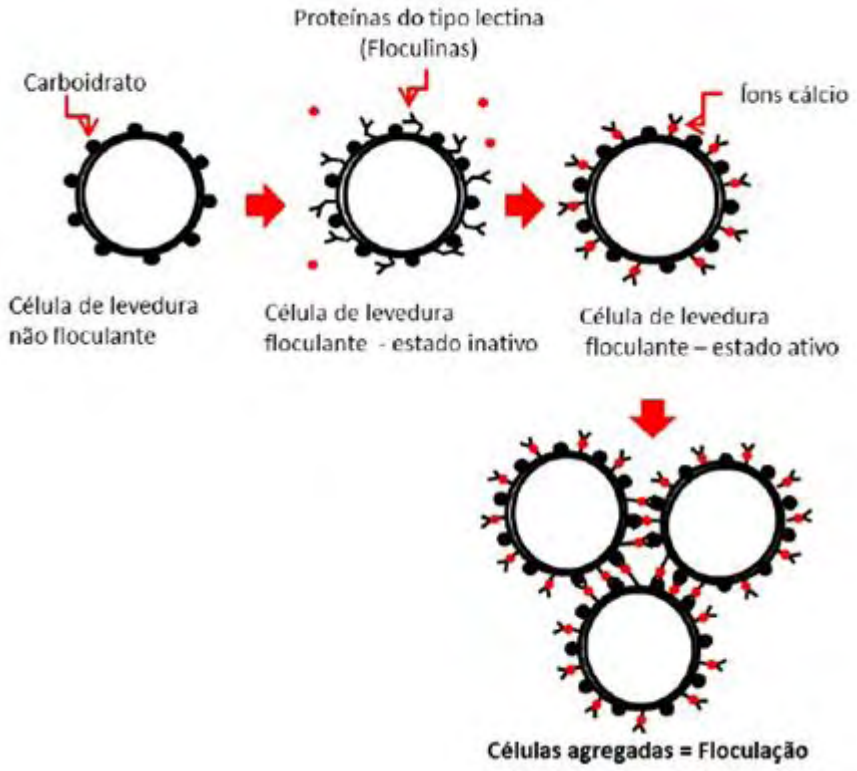


Fonte: Adaptado de Soares (2011).

O mecanismo físico pelo qual ocorre a floculação é denominado *Lectin-like Theory of Flocculation*, conforme Figura 5. Essa teoria sugere que ocorre a ligação entre lecitinas (floculinas) presentes na parede celular de células floculantes e resíduos de açúcar presentes na parede celular de células vizinhas, sendo esse processo reversível e dependente de cálcio (RODRIGUES, 2013).

Segundo Miki et al. (1982), estas proteínas de parede celular, chamadas floculinas reconhecem os carboidratos presentes na parede celular de células vizinhas. Para atingir sua conformação ativa, as floculinas requerem a presença de íons de cálcio. Agregação de células resultantes dessa interação é chamada de floculação.

Figura 5 - Esquema ilustrativo da teoria de floculação de leveduras



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2013).

Conforme Rodrigues (2013), as floculinas possuem uma estrutura comum de três domínios: um domínio C-terminal com uma âncora-GPI (glicosilfosfatidilinositol) que liga a floculina à parede celular; um domínio N-terminal, que sobressai da superfície celular e se liga a um carboidrato presente na parede celular de uma célula vizinha e um amplo domínio mediano caracterizado por múltiplas repetições ricas em serina e treonina codificada por sequências de DNA conservadas. A floculação prejudica o processo de produção de bioetanol, pois reduz o contato superficial celular com o substrato, reduzindo a cinética fermentativa e rendimento global. Também pode levar a problemas na etapa de centrifugação, causando obstrução de tubos.

As leveduras rugosas, por sua vez, estão frequentemente associadas ao crescimento de pseudohifas e alta taxa de sedimentação, causando problemas análogos aos observados em cepas floculantes. Observaram-se também colônias de leveduras ásperas, que são as rugosas, em 0-10% de colônias de estirpes industriais selecionadas, incluindo a cepa da levedura comercial PE-2, durante a sua implantação em fermentações industriais. Essa levedura PE-2 é a mais

conhecida no mercado e foi isolada da Usina da Pedra, que fica no município de Buritizal/SP, BASSO et al. (2008). Entretanto ainda não foram encontrados estudos que investiguem os fatores genéticos específicos envolvidos na transição de morfologia de colônia observada em cepas de levedura de bioetanol, ou seja, na transição entre levedura rugosa e lisa (RODRIGUES, 2013).

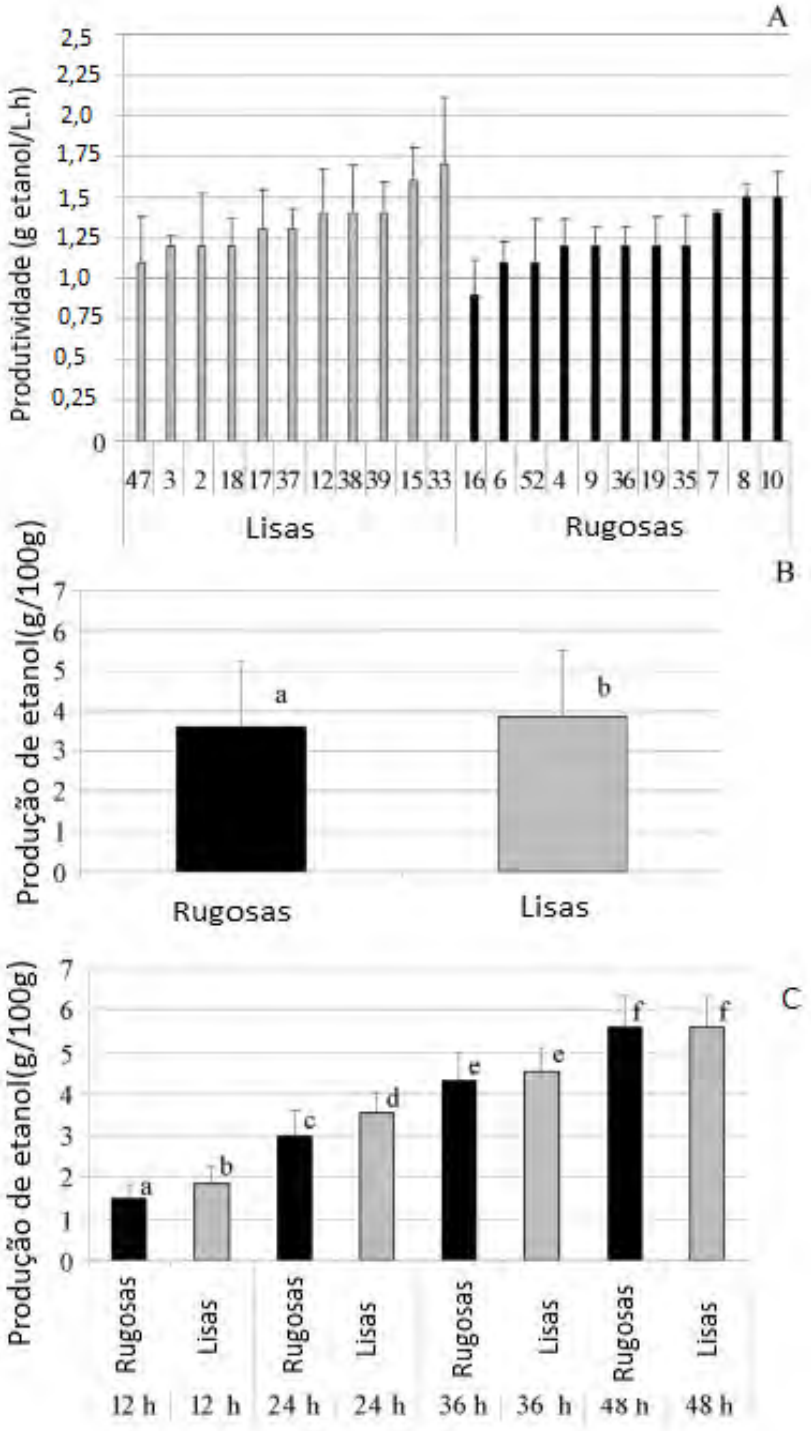
2.4 Levedura rugosa na fermentação etanólica

Basso et al. (1993) tendo feito estudos em unidades produtoras de etanol indicaram a predominância de leveduras contaminantes do gênero *Saccharomyces*. O monitoramento microbiológico da fermentação alcoólica, em diferentes unidades industriais e nas safras, indicou a presença de um biótipo de leveduras com células dispostas em cadeias, apresentando colônias opacas, superfície crespa, pertencendo à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Este biótipo foi denominado como levedura rugosa (conhecido fora do Brasil como floco de neve). Ele apresenta caracteristicamente alto crescimento, permanecendo na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma grossa, viscosa, causando transbordo de mosto nas dornas e consequentemente perda de açúcar e álcool. Verificou-se uma proporção aproximada de 1:1 entre leveduras rugosas e lisas não altera tanto o resultado. O monitoramento dessas leveduras indicou uma redução de 10% no rendimento fermentativo e 18% na produção de etanol em uma destilaria de Jaú/SP, quando totalmente rugosas. Mesmo as leveduras rugosas sendo muito frequentes na fermentação alcoólica, muito pouco se conhece sobre seu poder competitivo com linhagens típicas, que se apresentam como lisas, brilhantes, com células isoladas e brotamento normal. (BASSO et al., 1993; CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 1996; REIS, 2011).

É muito comum e indesejável durante o processo fermentativo entre as leveduras nativas encontradas na fermentação alcoólica, colônias rugosas associadas à morfologia pseudo-hifal pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Em testes realizados por Rodrigues (2013) a figura 6 (A) mostra 22 cepas (11 colônias de leveduras rugosas e 11 de leveduras lisas), onde as cepas das leveduras rugosas apresentaram capacidade fermentativa mais baixa e mais lenta comparadas às cepas das leveduras lisas num ciclo de 48 horas em um sistema descontínuo com caldo de cana-de-açúcar. Uma eficiência fermentativa

tão baixa quanto 60% foi observada apenas com a colônia da levedura rugosa, Figura 6(B). Normalmente numa indústria o ciclo varia de seis a oito horas.

Figura 6 - Comparação entre a produtividade e produção de etanol por leveduras lisas e rugosas. (A) Produtividade média (g álcool / L.h); (B) Produção de álcool (g / 100 mL) e (C) Produção de álcool (g / 100 mL) até 48h



Fonte: Adaptado de Reis (2013).

Os experimentos foram realizados em caldo de cana, com sólidos solúveis de 16ºBrix, pH 4,3, durante 48 horas de fermentação a 30 °C. Na Figura 6 (B) as letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas a 5% pelo teste de Tukey. A Figura 6 (C) mostra que as leveduras rugosas tanto produzem menos etanol como são mais lentas ao produzi-lo.

As células de *Saccharomyces cerevisiae*, quando submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados pelo estresse. Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento da concentração celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da ATPase (BIRCH; WALKER, 1999; REIS, 2011.

Em fermentações com *Saccharomyces cerevisiae* ocorre o acúmulo de trealose em resposta a uma mudança na temperatura de 30ºC para 44ºC, o que faz a concentração de trealose atingir valores intracelulares máximos. A resposta ao choque térmico é caracterizada pela síntese de proteínas específicas denominadas de proteínas de choque térmico ou *Heat Shock Proteins* (HTP), que funcionam como chaperonas nos processos de desnaturação e recuperação de proteínas danificadas, ou seja, agem evitando a desnaturação de outras proteínas vitais para a célula. As chaperonas são proteínas que têm como função assistir outras proteínas na obtenção de seu desdobramento apropriado. Além do choque térmico, essas alterações são induzidas por outras formas de estresse tais como: altas concentrações salinas e de etanol, estresse oxidativo, baixos valores de pH, escassez de nutrientes e presença de metais pesados no meio (REIS, 2011).

Ratchiff et al. (2015), estudaram a origem desse biótipo de levedura, nos quais foram verificados 1035 genes expressos de forma diferente quando comparadas uma linhagem unicelular de *Saccharomyces cerevisiae* com uma linhagem de levedura rugosa desenvolvida por evolução adaptativa. Sete dos dez genes de baixa regulamentação foram regulados pelo fator de transição ACE, todos com alelos idênticos na linhagem diploide. A perda da heterozigosidade no gene ACE2 (causado por uma mutação de mudança de fase) foi responsável pelo fenótipo de colônia de levedura rugosa nas linhagens estudadas por Rodrigues (2013). Ainda neste estudo com a utilização de derivativos espontâneos da

linhagem JAY270/PE-2 (PE-2 é a levedura comercial da Usina Buriti de Buritizal/SP). As linhagens apresentaram colônias de leveduras com superfícies rugosas, bordas irregulares e sedimentação celular semelhante à floculação em meio líquido, característica que não são próprias da linhagem de levedura selecionada PE-2.

Segundo Reis et al. (2017) as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* podem apresentar características típicas de colônias de leveduras tipo rugosas, que também se conhece como leveduras selvagens, constituídas por células agrupadas em estruturas pseudo-hifas e constituídas por gemas-filhas que não se separam da célula-mãe após a mitose. Estas estirpes são conhecidas por ocorrerem frequentemente em tanques de fermentação com rendimento de etanol significativamente menor quando comparadas com fermentações realizadas por estirpes lisas de *Saccharomyces cerevisiae* que são compostas de células dispersas. Na tentativa de delinear as diferenças genéticas e fenotípicas subjacentes aos dois fenótipos, foram analisados 10 *loci* de microssatélites de 22 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como resistência ao *stress* para altas concentrações de etanol e glicose, baixo pH e taxas de sedimentação celular. Os resultados obtidos nos testes fenotípicos por Análise de Componentes Principais (ACP) revelaram que, ao contrário das colônias de leveduras lisas, as colônias de leveduras rugosas de *Saccharomyces cerevisiae* exibem uma resistência aumentada a condições estressantes resultantes da presença de glicose e etanol em altas concentrações e também elevada taxa de sedimentação. A análise de microssatélites não foi bem-sucedida para distinguir entre os fenótipos de colônia como ensaios fenotípicos. A cepa industrial relevante PE-2 foi observada na proximidade genética próxima à colônia de levedura rugosa, embora não exiba esta morfologia de colônia, ou seja, mesmo DNA.

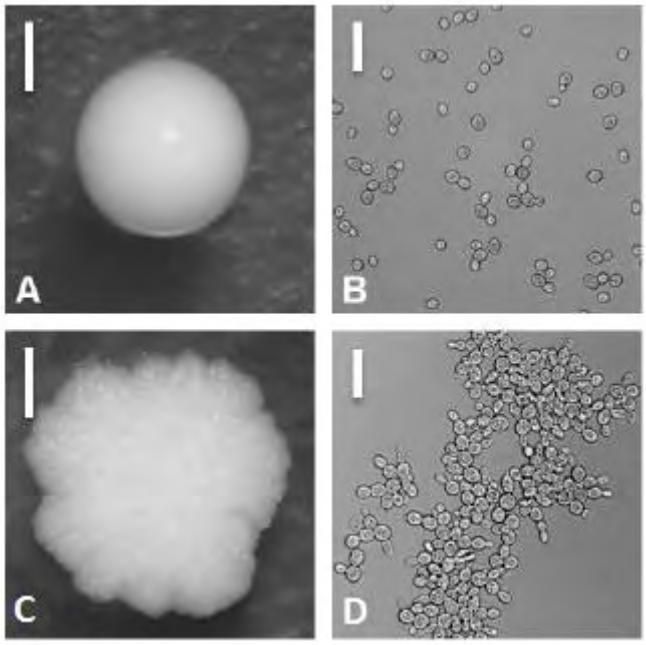
Rodrigues (2013) identificou ACE2 como o gene responsável pelo fenótipo rugoso na levedura e descobriu que uma célula derivada de PE-2 (JAY270) é heterozigoto para um alelo defeituoso deste gene (ACE2/ACE2-7A). Estas descobertas demonstraram que este fenótipo apareceu em JAY270 por meio de cópia-neutra de recombinação mitótica levando a perda de heterozigosidade (LOH).

Ainda no estudo de Rodrigues (2013) o fenótipo destas estirpes foi estavelmente mantido ao longo de várias gerações clonais, sugerindo que era

provável que fosse ligado por via genética, em oposição a ser causado por um estado transitório transicional alterado. Eles estimaram que as colônias de leveduras rugosas apareceram com uma frequência de cerca de uma em cada 10.000 colônias que cresciam em placas de meios ricos. Assumindo uma origem genética e com base na sua alta frequência de ocorrência, entenderam que este fenótipo era improvável de ser causado por uma rara mutação de nucleotídeo, mas em vez disso, recombinação mitótica levando a perda de heterozigosidade (LOH) forneceu uma explicação mais plausível.

A Figura 7 (A e B) mostra o aspecto de uma colônia de levedura lisa e as células soltas de uma vista de suas células ao microscópio de uma colônia lisa; Já a Figura 7 (C) mostra o aspecto em forma de ¨flor" ou "floco de neve" de uma colônia de levedura rugosa e sua correspondente imagem ao microscópio, Figura 7 (D), que são as células aos cachos.

Figura 7 - (A) Colônia lisa, (B) Células soltas que formam a colônia lisa, (C) Colônia Rugosa e (D) Pseudohifas, células que brotaram e não se soltaram



Fonte: Extraído de Rodrigues (2013).

.

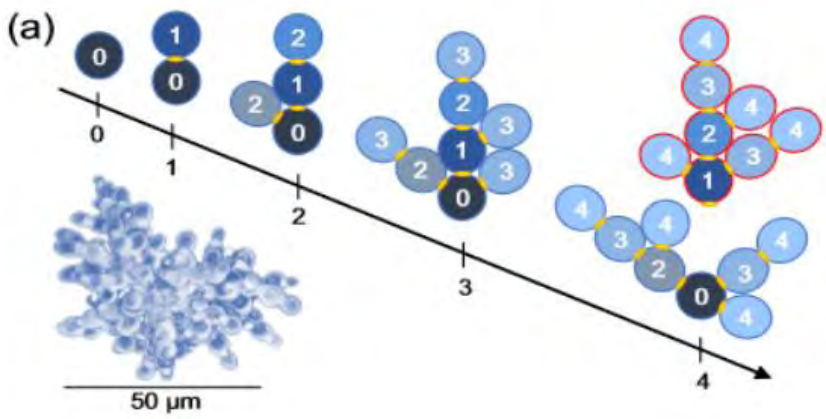
Foi observado por Rodrigues (2013) também que o cruzamento de dois descendentes haplóides específicos do derivado de PE-2 resultou em células diploides com a mesma morfologia de colônias de leveduras ásperas, rugosas, e o padrão de ligação celular mãe-filha observado nos derivados espontâneo. Este

resultado foi inesperado porque essas células e todos os outros derivados haploides têm o fenótipo normal de colônia lisa. Esta observação fortuita forneceu uma indicação de que o fenótipo da colônia áspera pode ser diploide específico e a capacidade de reproduzir consistentemente o fenótipo mutante em um cruzamento controlado entre haploides bem caracterizados abriu um caminho para investigar sua base genética.

O que desencadeia a formação desses conjuntos são condições de estresse. Tem-se como ilustração, em alguns casos, as sofisticadas vias de sinalização as quais transmitem flutuações ambientais de fora para dentro e, em outras, que flutuações externas afetam diretamente as condições internas nas células. Argumenta-se ainda que mudanças na organização do citoplasma e na formação de compartimentos sem membranas têm muitas vantagens sobre outras formas de alterar a função da proteína, tais como degradação, tradução ou transcrição de proteínas. Além disso, os compartimentos sem membrana podem atuar como dispositivos de proteção para os principais componentes celulares (RABOUILLE, 2017).

Jacobeen et al. (2018), demonstraram que a levedura do tipo “floco de neve" multicelular, ou seja, a levedura rugosa desenvolvida em laboratório, supera prontamente as barreiras físicas que limitam o tamanho do aglomerado modificando a geometria. No entanto, não está claro por que esta rota para o tamanho grande é observada, em vez de um aumento evoluído na força de ligação intercelular. Na Figura 8 foi usado um modelo geométrico da forma de crescimento de levedura rugosa para demonstrar a eficiência geométrica de tamanho crescente, modificando a geometria e a força de adesão. Descobriu-se que a mudança da geometria é uma rota muito mais eficiente para o tamanho grande do que a crescente adesão intercelular.

Figura 8 - Esquema bidimensional da morfologia do crescimento das leveduras rugosas, mostrando uma formação celular-ocular desfigurada. Início: Imagem confocal tridimensional de um aglomerado de levedura rugosa



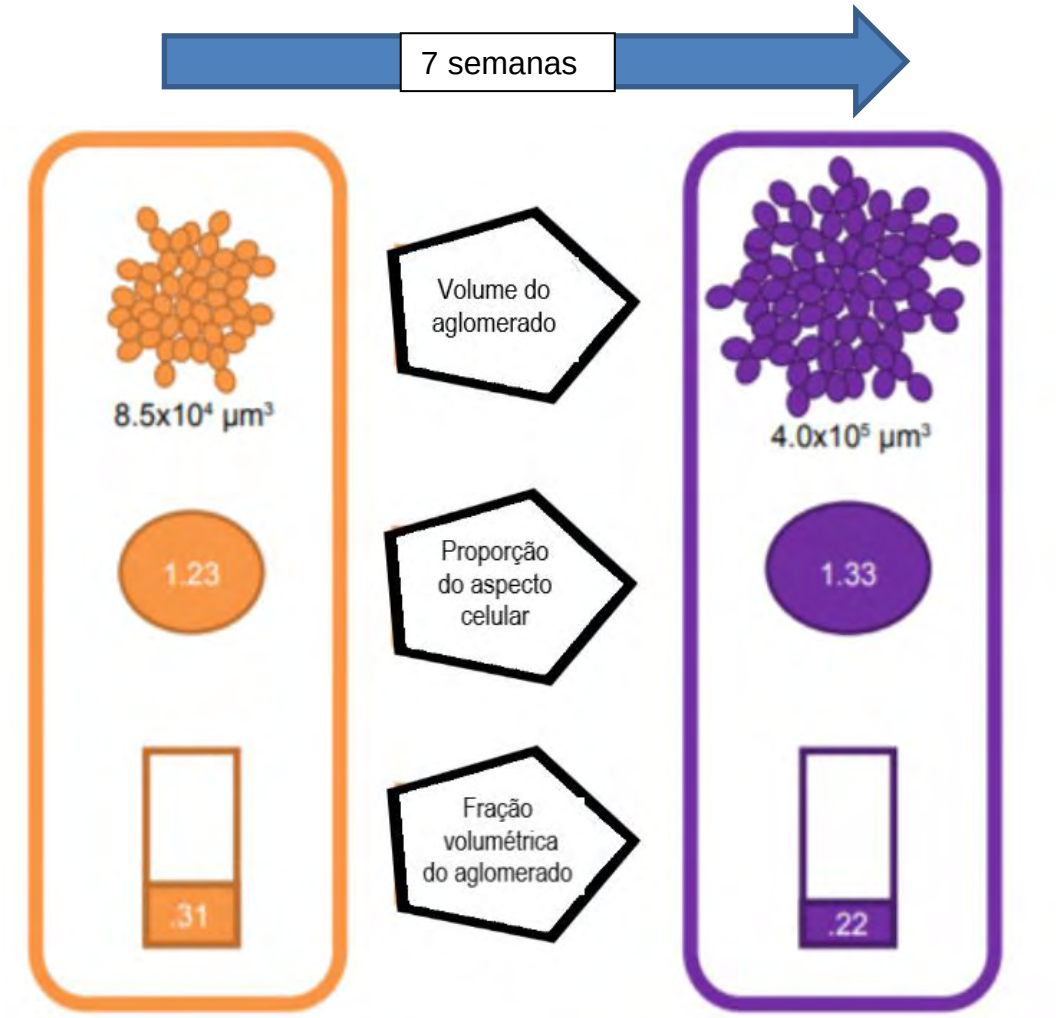
Fonte: Jacobeen et al. (2018).

Ainda segundo de estudo de Jacobeen et al. (2018), no caso da levedura do tipo ‘’floco de neve”, que são as chamadas de leveduras tipo “rugosas” aglomerados multicelulares simples de *Saccharomyces cerevisiae* são submetidos a seleção diária para tamanho grande; eles evoluem rapidamente para duplicar seu número máximo de células por aglomerado em apenas 7 semanas. A Figura 9 mostra um aumento no aglomerado das células de 8,5 x 10^4 para 4,0 x 10^5 μm^3, mas no entanto sua fração volumétrica do aglomerado de células é bem menor pelos espaços vazios que existe entre elas ao se justapor.

O tamanho do aglomerado de levedura rugosa é limitado pela fratura das ligações intercelulares sob estresses induzidos pelo crescimento, conforme Figura 9.

O tamanho maior da fratura é obtido principalmente por uma simples mudança na geometria do aglomerado: mais de 1291 gerações, a levedura rugosa evoluiu para ter células mais alongadas. Já a modificação da forma da célula, do ângulo de brotamento ou da variação dessas quantidades altera a forma como as células são compactadas, diminuindo o acúmulo de estresse interno (JACOBEEN et al., 2018).

Figura 9 - Mudanças ao longo de 7 semanas de evolução experimental em valores médios de tamanho do aglomerado de levedura, proporção do aspecto celular e fração volumétrica do aglomerado

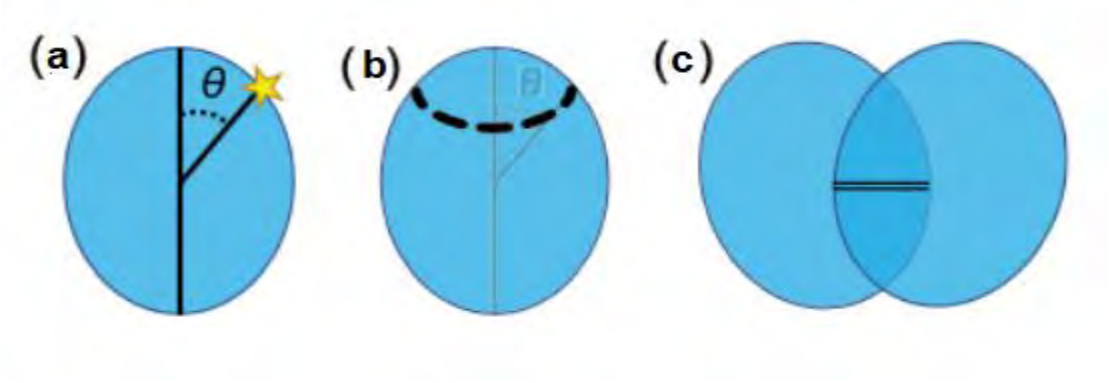


Fonte: Adaptado de Jacobeen et al. (2018).

Na Figura 10 (a) novas células são guiadas na superfície do sua filha em um local de ligação (estrela amarela) definido pelo ângulo polar θ do maior eixo da célula; esse ângulo é chamado de “ângulo de fixação”. Já na Figura 10 (b) se girar o ângulo θ ao redor do eixo principal da célula define um anel em sua superfície ao longo do qual as células-filhas podem ser colocadas aleatoriamente (linha tracejada); esse anel é denominado “anel de brotamento”. Figura 10 (c) se observa o comprimento da linha dupla onde ilustra a sobreposição linear entre duas células. Nas investigações genéticas sobre as diferenças entre leveduras lisas e rugosas, há poucos estudos disponíveis sobre as condições que levam ao aparecimento das leveduras rugosas, como o estresse durante o processo fermentativo. Este estresse fermentativo é capaz de causar alterações fenotípicas, transformando leveduras lisas em rugosas, sem que haja necessariamente alteração genética das células. Um dos principais fatores responsáveis por essa transformação fenotípica é o

aumento da temperatura nas dornas de fermentação. Desse modo, o controle de temperatura nos sistemas de fermentação é um fator importante no controle do desenvolvimento de leveduras rugosas com impactos significativos no rendimento da produção de etanol.

Figura 10 - Simulação geométrica do crescimento do aglomerado



Fonte: Adaptado de Jacobeen et al. (2018).

Desta forma este estudo faz comparação nesta dissertação sobre as diferenças nos resultados de produção de bioetanol com leveduras rugosas (células aos cachos) e leveduras lisas (células soltas), tanto em escala de bancada como em industrial.

Como na fermentação com matéria-prima oriunda da cana de açúcar o modo operacional é de reciclo de células, onde a massa celular retorna e é utilizada inúmeras vezes, a falta de refrigeração adequada dos tanques de fermentação incorre neste fenômeno acima observado.

Ressaltando que em outros países onde é estudado este fenômeno de transformação de lisas em rugosas a massa celular não é reutilizada, uma vez que o substrato utilizado para a fermentação é o milho.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de etanol comparando uma levedura do processo transformada e uma levedura rugosa em escala laboratorial e industrial.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar fermentações com leveduras do processo transformada e rugosa avaliando o rendimento na produção de etanol em escala laboratorial e análise através de cromatografia;
- Validar a produção etanólica pela fermentação com levedura lisa, rugosa e do processo transformada;
- Avaliar a aplicação da levedura do processo transformada em escala industrial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Pesquisa:

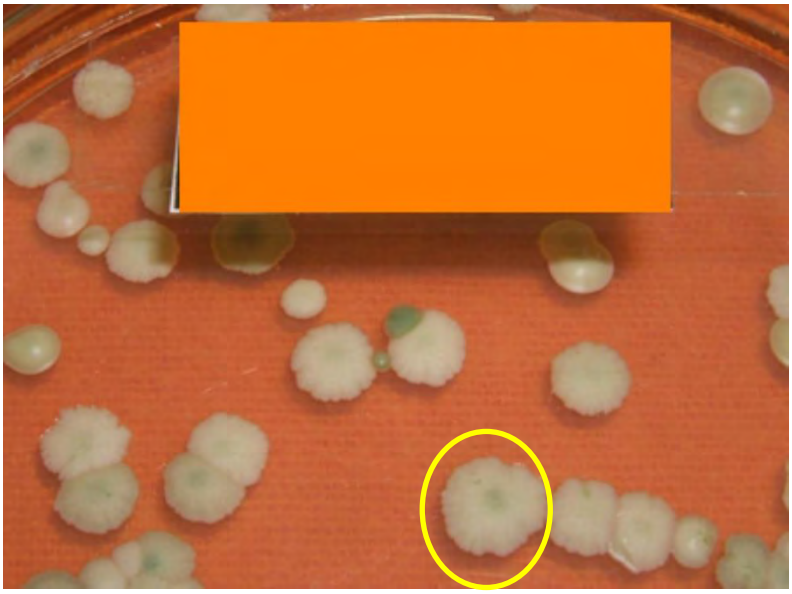
a) Microbiologia localizado em Pirassununga- SP (www.microservbio.com.br)
b) Bioprocessos – FZEA USP, Pirassununga/SP

4.1 Levedura Rugosa (LR) e Levedura (LPT) utilizadas na pesquisa

Foi escolhida uma linhagem de levedura rugosa (LR) (que possui pseudohifas, ou seja, cujos brotos não são liberados durante o processo de multiplicação celular) proveniente de uma usina de etanol da região de Pirassununga/SP, cuja temperatura da fermentação é fica entre 33 e 37ºC.

Pode ser observado da Figura 11 a colônia de onde foi obtida a massa celular da levedura rugosa através isolamento em meio de cultura WLN.

Figura 11- Colônia de levedura rugosa da Usina em estudo.



Fonte: Autora, 2018.

A transformação desta levedura rugosa em levedura lisa foi feita por método desenvolvido pelo Laboratório da Microserv Biotecnologia Ltda. (sob sigilo industrial) baseado no controle de temperatura e esta levedura passou a se chamar LPT.

4.2 Comparação da produção de etanol em escala laboratorial

A avaliação foi feita um delineamento fatorial completo com 2^2 pontos + 3 pontos centrais para avaliar as variáveis independentes: X1 (proporção entre leveduras rugosas (LR) e leveduras do processo transformada (LPT) e X2 (concentração de açúcar redutor total inicial no mosto). A Tabela 1 apresenta os níveis codificados e reais, que foram utilizados para produção do etanol, conforme as condições de cada ensaio do fatorial 2^2.

Tabela 1 - Nível codificado e real das concentrações de leveduras e ART inicial (Açúcar Redutor Total) no delineamento fatorial.

Nível	-1	0	+1
X1 – levedura (%)	100% LR	50 % LPT: 50%LR	100% LPT
X2 – conc. ART_i (%)	10	15	20

LR: Levedura Rugosa; LPT: Levedura do Processo Transformada. Fonte: Própria

Os ensaios, conforme a Tabela 1, foram conduzidos em frascos de volume útil de 50 mL em agitador orbital, temperatura de 32 ºC, a de volume útil agitação de 160 rpm por 8 horas com 2% m/v de leveduras. Ao final das fermentações, as amostras foram filtradas em membranas de 22 micrômetros e o filtrado obtido (vinho) foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de etanol, ART, glicerol, ácido succínico, ácido láctico e ácido acético.

4.3 Obtenção da massa celular das leveduras LR e LPT para os testes fermentativos do fatorial 2^2

Para a obtenção da massa celular que foi utilizada conforme a Tabela 4.3 dos dois tipos de levedura (LR e LPT) fez-se os *slants* em tubo de ensaio de com meio de cultura WLN (Wallerstein) e se semeou a colônia da levedura rugosa isolada e deixando-a crescer à temperatura de 32ºC em estufa. À massa celular crescida foi acrescentada água estéril, centrifugada e daí pesou-se 1 grama desta massa úmida da levedura, conforme as condições do fatorial 2^2 (Tabela 2 e Tabela 3).

Foi utilizado o meio de cultura WLN é do Laboratório Wallerstein (WLmeio nutriente, marca DIFCO 0424-17-9).

Da mesma forma, obtida a levedura com célula solta LPT (que significa levedura do processo transformada) proveniente da levedura rugosa (LR), foi feita a propagação celular para obtenção de massa celular conforme a Tabela 5.

Tabela 2 - Mosto com as concentrações de açúcar inicial e concentrações de LPT e LR para preparo de todos os ensaios do fatorial 2^2 para a produção de etanol

Ensaios do Fatorial 2^2	**Mosto com % de ART_i X1**	**Preparo da % das leveduras LPT e LR X2**
1	**10%**	1 g de LPT+ 9 mL de mosto estéril
2	**10%**	1 g de LR + 9mL de mosto estéril
3	**20%**	1 g de LPT + 9mL de mosto estéril
4	**20%**	1 g de LR + 9mL de mosto estéril
5, 6 e 7 pc	**15%**	0,5 g de LPT+ 0,5 g de LR + 9mL de mosto estéril

ART – açúcar redutor total, pc – ponto central, LPT levedura do processo transformada e LR-levedura rugosa. Fonte: Própria

Para o mosto estéril com 10% de sacarose P.A; 2,5% de fosfato de potássio; 2,5% de cloreto de amônio; 0,5% de sulfato de magnésio; 0,5 % de cloreto de Potássio e 3% de extrato de levedura diluídos em 100 mL de água.

4.4 Validação da melhor condição do fatorial 2^2 para a produção de bioetanol

Foram feitos ensaios em triplicatas utilizando os 3 tipos de leveduras:

- levedura lisa (LPT) que foi colocada no início da safra pela usina em estudo;
- levedura rugosa (LR) que é a estressada da inicialmente levedura lisa (LL);

A concentração de açúcares foi definida pelo fatorial 2^2 e comparação das médias das respostas de etanol (%), ART (%), em ppm as concentrações do glicerol e dos ácidos láctico, acético, succínico, que foi aplicado o teste de Tukey a $p \leq 0,05$.

4.5 Obtenção das amostras de fermento para o acompanhamento da fermentação no processo industrial

A cada semana foi coletada uma amostra do material da fermentação da Usina em tubo FALCON num total de 32 amostras na safra de 8 meses de 2018, e também a safra de 2019. Deste material foi feito plaqueamento para a contagem das leveduras em meio de cultura WLN e foram isoladas as colônias para a pesquisa, Figura 12.

Figura 12- Amostras da fermentação coletadas num tubo Falcon

Fonte: Autora, 2018.

Nos meses de abril a setembro de 2019 também foram coletadas 24 amostras para estudo da porcentagem de lisas e rugosas.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC)

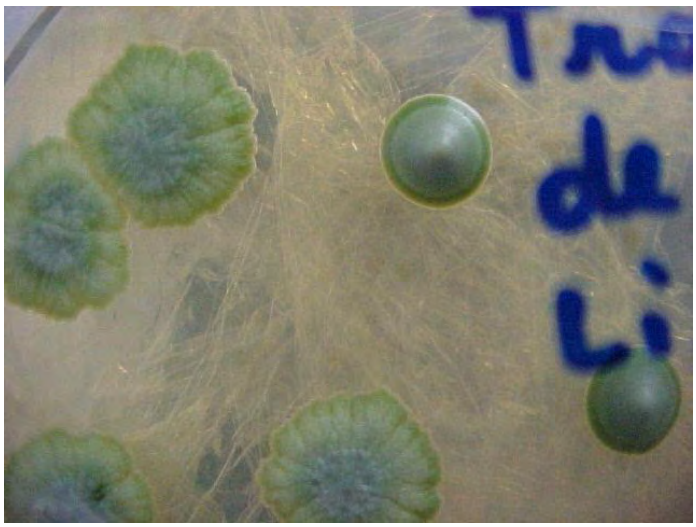
As análises de concentração de etanol, de açúcares redutores totais e de metabólitos secundários (ácido láctico, ácido acético e ácido succínico) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A análise de açúcares, etanol e dos metabólitos secundários (ácido acético, láctico e succínico) foi realizada em equipamento HPLC modelo Varian 9010 com coluna Shodex modelo KS 801 na temperatura de 70 ºC, fase móvel com ácido sulfúrico 0,005 mol/L, água deionizada e desareada como eluente, fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 35 minutos (ATALA, 2000; SOUSA et al., 2008).

4.6.2 Contagem das colônias de leveduras para porcentagem de lisas e rugosas

A determinação da concentração de leveduras lisas e rugosas foi realizada através do plaqueamento em meio WLN discriminando-se os dois tipos de fenótipos, aparência de lisas (colônias brilhantes) e aparência em forma de flor (colônias opacas) na hora da contagem das colônias desenvolvidas no meio (REIS, 2017).

O verde de bromocresol é absorvido pelas leveduras de maneira diferenciada para cada tipo de DNA e desta forma se consegue avaliar de uma maneira subjetiva a identidade das leveduras, Figura 13.

Figura 13 - Nuances da levedura Rugosa (LR) em forma de flor e a redonda que é a LPT que antes tinha o formato de flor



Fonte: Autora, 2018.

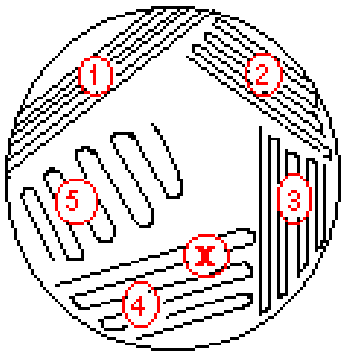
Para a contagem da porcentagem de leveduras do processo transformada (LPT) e rugosas (LR) crescidas em meio de cultura WLN, conta-se as que tem a aparência de flor (floco de neve) e as esféricas brilhantes que são as LPT`s. Por exemplo temos uma placa com 50 colônias no total. Se 30 forem de leveduras LPT e 20 forem de leveduras rugosas (LR) tem-se como resultado 60% lisas e 40% rugosas.

4.6.3 Isolamento das leveduras para obtenção de massa celular

A levedura LPT da Figura 14(A) foi isolada através de alça de platina carregada e fazendo estriamento em uma placa de Petri contendo meio WLN solidificado, espalhando a amostra no 1º Setor (2); (3); (4): Sem recarregar a alça foi se esgotando a amostra da colônia rugosa nos setores sucessivos: (4 x): Após esterilizar a alça e deixá-la esfriar, foi recarregada na área x e estriada na área (5). Após estufa a 32 ºC e tempo de crescimento de 4 dias, Figura 14(B), da colônia crescida foi obtida a massa celular para a pesagem de 1g.

Figura 14 - Isolamento de levedura em meio WLN

(A) (B)



Fonte: Autora, 2019.

Este isolamento é necessário, pois várias vezes as colônias de leveduras podem montar umas sobre as outras.

4.7. Análise estatística

A análise estatística dos planejamentos experimentais, anova e teste de Tukey foram feitos utilizando o software Statistica version 13.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em três partes (1) planejamento fatorial 2^2 para avaliar a produção de etanol em escala laboratorial com a levedura do processo transformada (LPT), levedura rugosa (LR) e uma mistura das mesmas, (2) a validação do processo de produção para comparar a produção de etanol utilizando a levedura lisa (LL), a LR e a LPT. A levedura LL representa a levedura de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada no processo fermentativo na Usina na região de Pirassununga, antes de se tornar rugosa e (3) finalmente na escala industrial verificado o comportamento da levedura LPT durante a safra de 2018 e 2019 nesta usina.

5.1 Planejamento fatorial 2^2 para avaliar a produção de bioetanol em escala laboratorial

A Tabela 3 apresenta a planilha do fatorial 2^2 com as respostas referentes ao rendimento de etanol, açúcar redutor total no final do processo fermentativo (ART_f) e as concentrações em ppm de glicerol e dos ácidos succínico, acético e láctico.

Tabela 3 - Delineamento fatorial completo para produção de etanol utilizando leveduras do processo transformada (LPT) e rugosa (LR)

ensaios	X1 Levedura (%)	X2 ART_i (%)	Y1 Etanol (%)	Y2 ART_f (%)	Y3 Glicerol (ppm)	Y4 Ácido Succinico (ppm)	Y5 Ácido Acético (ppm)	Y6 Ácido láctico (ppm)
1	-1(100% LR)	-1(10)	4,829	0,088	632,527	698,077	819,472	147,256
2	+1(100% LPT)	-1(10)	5,088	0,088	640,512	675,834	836,165	76,878
3	-1(100%LR)	+1(20)	9,647	0,666	1026,495	909,929	1693,989	136,590
4	-1(100%LPT)	+1(20)	10,309	0,096	1037,179	964,909	1403,002	94,023
5pc	0(50%LR:50%LPT)	0(15)	7,570	0,087	887,766	920,104	1141,670	174,495
6pc	0(50%LR:50%LPT)	0(15)	7,554	0,086	912,619	915,127	1288,847	168,197
7pc	0(50%LR:50%LPTL)	0(15)	7,692	0,088	877,296	949,708	1242,523	85,843

pc-ponto central; ART açúcar redutor total, i- inicial, f- final, AS: Ácido Succínico; AA: Ácido Acético; AL: Ácido Láctico; X_i –variáveis independentes, Y_i-respostas analisadas no fatorial. Fonte:Autora , 2018.

Os valores das concentrações de açúcar redutor inicial (ART_i) em porcentagem variou de acordo com os valores usados em usinas no Brasil, quais sejam entre 10 e 20%. E as leveduras LR e LPT para avaliar a produção de etanol num processo em escala laboratorial, quando temos 100% de LR, uma mistura de 50% de LR e LPT e 100% de LPT.

Podemos observar pela Tabela 3 que o melhor rendimento de etanol de 10,309% foi nas condições do ensaio 4 com 100% de levedura LPT e 20% de açúcar redutor total inicial (ART_i). Se compararmos com o ensaio 3 que apresentou um rendimento de 9,647% com 100% e levedura LR e 20% de açúcar redutor total inicial, tem-se um aumento no rendimento 6,86% na produção de bioetanol. Se exemplificarmos por safra anual teríamos um ganho de 6.860.000 litros de etanol na usina estudada, que possui 100 milhões de litros de etanol por ano.

5.1.1 Análise do planejamento experimental para a produção de etanol comparando as leveduras rugosas (LR) e do processo transformadas (LPT) – fatorial completo 2^2

A análise fatorial 2^2 foi feita para verificar como a concentração de açúcar redutor total inicial (ART_i) e as leveduras influenciaram na produção de bioetanol em escala laboratorial.

A Tabela 4 apresenta os efeitos principais e de interações, pode-se notar que os efeitos principais de levedura e concentração de ART_i que foram estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$. Pode ser observado que quando alteramos a levedura LR para a LPT tem se um ganho em média de 0,461 % no rendimento em etanol e para a concentração de ART_i tem se um ganho de 5,1% quando alteramos para de 10 para 20% em ART_i, o que já era de se esperar, pois mais açúcar nesta faixa utilizada aumenta o rendimento em etanol. E com relação a interação entre a levedura e ART_i tem se um ganho de 0,2% no rendimento em etanol, mas não foi estatisticamente significativo a $p \leq 0,05$.

Tabela 4 - Efeitos principais e de interação na produção de etanol

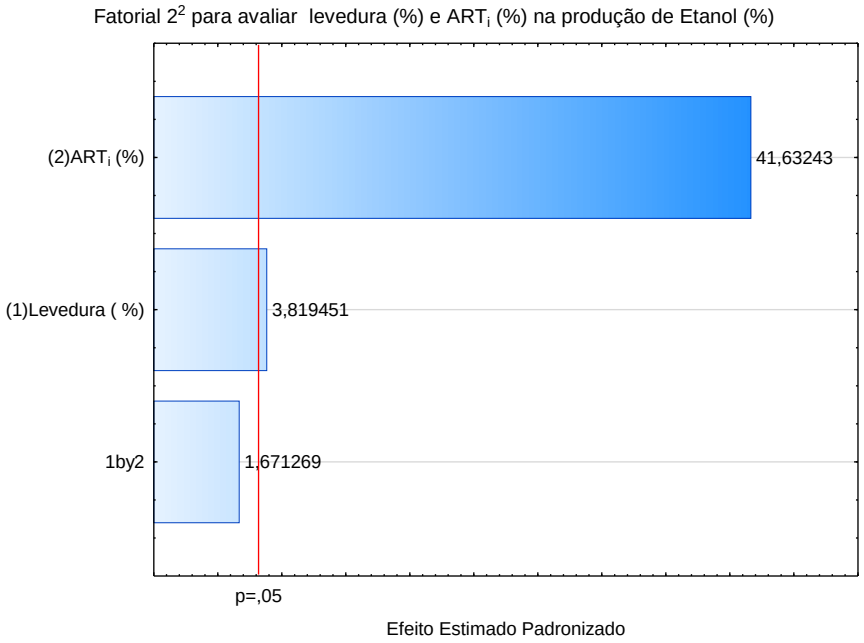
Fator	Efeito (%)	Erro Padrão	t(3)	p-valor	LC -95,%	LC +95,%
*Média	7,527	0,046	165,174	0,000	7,382	7,672
*X1-Levedura (%)	0,461	0,121	3,820	0,032	0,077	0,844
*X2- ART_i (%)	5,020	0,121	41,632	0,000	4,636	5,403
X1 versus X2	0,202	0,121	1,671	0,193	-0,182	0,585

*p≤0,05 e LC-limite de confiança, ART_i – açúcar redutor total no início da fermentação.
Fonte: Autora ,2018.

O diagrama de Pareto mostra os efeitos principais e de interação do fatorial 2^2 para a produção de bioetanol, Figura 15. Pode-se observar pelo comportamento da produção de etanol que as variáveis independentes principais concentrações de açúcar redutor total inicial (ART_i) e leveduras que apresentaram um aumento na resposta produção de bioetanol. Enquanto que a interação destas variáveis não apresentou efeito estatisticamente significativo a p≤0,05.

As barras horizontais representam a magnitude das estimativas de efeitos divididas pelo erro padrão (efeito estimado padronizado). As barras que cruzam a linha pontilhada representam efeitos estatisticamente significativos com confiança de limite de 95% ou a p≤0,05.

Figura 15 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados padronizados do fatorial 2^2 para produção de etanol (%)



Fonte: Autora, 2018.

Pela Tabela 5 podemos observar os coeficientes de regressão da equação de primeira ordem, que representa o rendimento de etanol como resposta sendo influenciado pelas variáveis independentes a concentração de açúcar redutor inicial e as leveduras.

Tabela 5 - Coeficientes de regressão do fatorial 2^2 para avaliação da produção de etanol (%)

Fator	(βi)	CR (%)	EP	t(3)	p-valor	LC -95,%	LC +95,%
*Média	(β_o)	7,5270	0,0456	165,17	0,0000	7,3820	7,6720
*X1- Levedura (%)	(β_1)	0,4605	0,1206	3,8195	0,0316	0,0768	0,8442
*X2- ART_i(%)	(β_2)	5,0195	0,1206	41,6324	0,0000	4,6358	5,4032
X1 versus X2	(β_{12})	0,2015	0,1206	1,6713	0,1933	-0,1822	0,5852

*variáveis estatisticamente significativas a p≤0,05, βi, ART_i – açúcar redutor total inicial e CR – coeficientes de regressão, EP – Erro padrão, LC-limite de confiança. Fonte: Autora, 2018.

Por meio dos coeficientes de regressão do fatorial 2^2, pode-se obter a equação 3 (a) modelo completo e Equação 3 (b) modelo reduzido:

$Y(\%)= \beta_o + \beta_1 . X1 + \beta_2.X2 + \beta_{12}.X1.X2$ ou seja, Eq. 3 a

Então substituindo-se, os valores dos coeficientes de regressão da Tabela 5

Etanol (%)= 7,527*+0,4605*.X1+ 5,0195*.X2 Eq. 3 b

*estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança

A análise de variância (ANOVA) foi feita tanto para o modelo completo o reduzido, Tabela 6 e 7, respectivamente. O modelo completo representa a equação de primeira ordem envolvendo todos os parâmetros (4) e o modelo reduzido (3), que representa a equação 3 (b) apenas com os coeficientes estatisticamente significativos a p≤0,05.

Tabela 6 - ANOVA para o fatorial 2^2 para a produção de etanol – modelo completo

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão ®	25,4475	p-1 (4-1)	8,4825	585	9,28	$1,2.10^{-4}$
1,2Resíduo (r)	0,0436	n-p (7-4)	0,0145			
Total (T)	25,4917	n-1				

n- número de ensaios realizados (7), p- nro de parâmetros da equação 1 completa (4),
$F_{tabelado}$ com 95% de confiança $F_{\gamma R, \gamma r}$, γ- graus de liberdade – $F_{3,3, 95\%}$=9,28
% variação explicada (R^2): SQ_R/SQ_T = 0,998
O $F_{calc.}$ (QM_R/QM_r) maior que o $F_{tab.}$ no nível de 95% de confiança.
Fonte: Autora, 2019.

Tabela 7 - ANOVA para o fatorial 2^2 para a produção de etanol – modelo reduzido

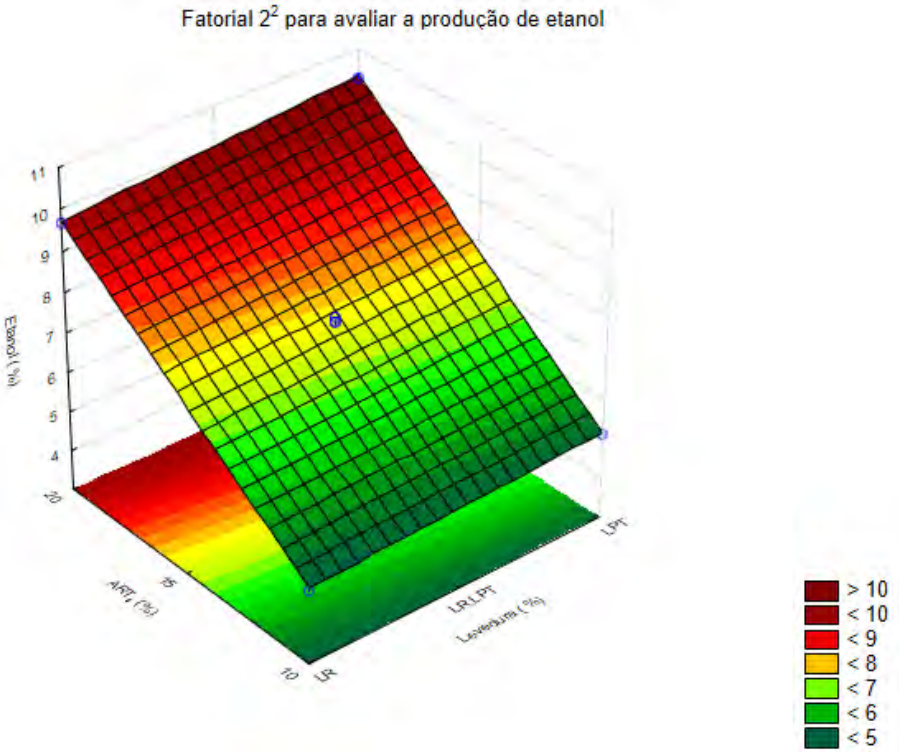
Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão (R)	25,4475	p-1(3-1)	12,704	603,42	6,94	$1,09.10^{-5}$
Resíduo (r)	0,0436	n-p (7-3)	0,021			
Total (T)	25,4917	n-1 (7-1)				

n- número de ensaios realizados (7), p- nro de parâmetros estatisticamente significativos a p ≤0,05 da equação 1,
$F_{tabelado}$ com 95% de confiança $F_{\gamma R, \gamma r}$, γ- graus de liberdade – $F_{2,4,95\%}$=6,94.
% variação explicada (R^2): SQ_R/SQ_T = 0,998
O $F_{calc.}$ (QM_R/QM_r) maior que o $F_{tab.}$ no nível de 95% de confiança
Fonte: Autora, 2019.

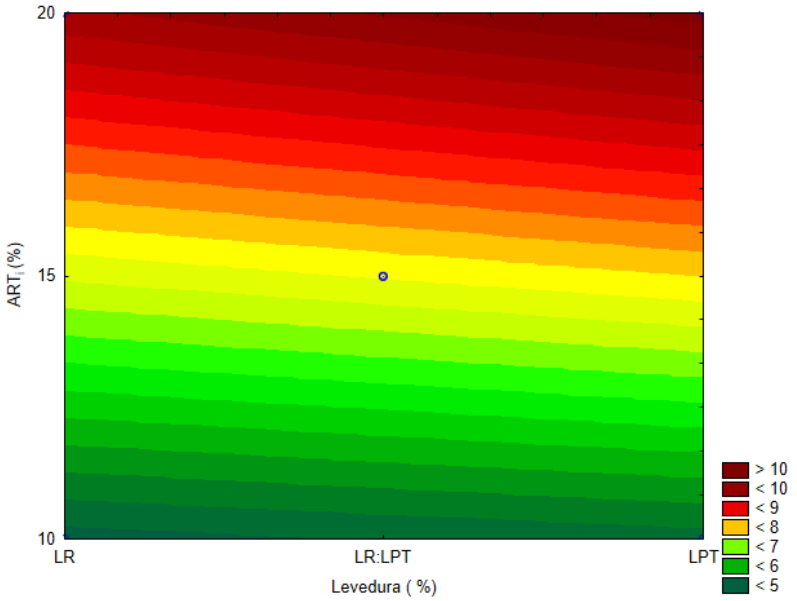
Como pode ser observado pela Anova, o Teste F tanto para o modelo completo ou reduzido o valor de F calculado foi maior que o F tabelado, desta forma pode-se obter a superfície de resposta e curva de contorno deste fatorial 2^2 para a produção de etanol, Figura 16 (a e b).

Conforme a Figura 16 pode ser observado que para maiores concentrações de açúcar redutor total inicial (ART_i), tanto para levedura (LPT) como para a levedura rugosa (LR), obteve-se maiores rendimentos de etanol (%), ou seja, o efeito da levedura é menor que o efeito do ART_i. Nestes casos é interessante fazer uma validação, fazendo ensaios em triplicatas das fermentações para avaliar o comportamento das leveduras para uma mesma concentração de ART_i.

Figura 16 - Superfície resposta e curva de contorno para a produção de etanol



(a)



(b)

Fonte: Autora, 2018.

Os resultados do tratamento estatístico, com 95% de confiança, para a variável resposta produção de etanol mostram que obteve 10,31% de etanol utilizando 100% LL e 20% de ART.

5.2 Validação de métodos com as diferentes leveduras para a produção de etanol (%)

A validação é muito interessante para observar como as leveduras LR e LPT influenciam o rendimento de etanol para uma mesma concentração de açúcar redutor total inicial no processo fermentativo. Nesta validação foi verificado a influência da levedura lisa (LL) que é a levedura inoculada no início da safra numa usina de álcool, da levedura rugosa (LR) que adquire este aspecto devido as condições de *stress* do processo de produção de etanol e a levedura do processo transformado (LPT), que é a levedura transformada pelo Laboratório da empresa Microserv Biotecnologia Ltda, localizada em Pirassununga/SP.

A concentração de açúcar redutor total inicial (ART_i) foi fixada em 15%, mesmo o fatorial 2^2 tendo indicado que para maiores concentrações de ARTi de 20% dentro da faixa utilizada de 10 a 20%. Como a média de ARTi utilizadas nas usinas ficam em torno de 15%, optou-se neste estudo fazer com este valor de concentração para fermentação ser realizada próxima das condições da escala industrial.

As Tabelas 8 e 9 apresentam a validação por meio das diferenças das médias pelo teste de Tukey entre as triplicatas mantendo a concentração de açúcar redutor total inicial (ART_i) de a 15% e alteração as leveduras lisa, rugosas e do processo transformada. Conforme Tabela 8 as leveduras rugosas (LR) produziram mais ácido láctico que as leveduras lisas (LL) com mesma concentração substrato de 15% de ART_i, nas mesmas condições estéreis e sem nenhuma influência de bactérias. E ainda de acordo com a Tabela 9 com relação ao glicerol sua produção, é sempre proporcional a produção de etanol; com relação à produção de etanol comparativa as leveduras lisas converteram 7,2% a mais de etanol com o mesmo substrato.

Pode ser observado que o rendimento de etanol não apresentou diferenças estatisticamente significativa a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey entre a levedura lisa do início do processo fermentativo com a levedura do processo transformada, ressaltando que a levedura lisa se transforma em levedura rugosa durante o processo de fermentação nas condições de *stress*, que comumente é o que ocorre nas usinas alcooleiras.

Tabela 8 - Valores das triplicatas para cada tipo de levedura e as respostas açúcar redutor total final da fermentação (ART_f), AS (ácido succínico) e ácido láctico (AL).

Ensaio	ART_f $\%_i$	*$média_{ART}$	AS ppm	*$média_{AS}$	AL ppm	*$média_{AL}$
[1]LL	0,140		995,130		401,135	
[2]LL	0,132	$0,134^A$	934,345	960^A	293,036	363^A
[3]LL	0,129		949,867		393,526	
[1]LPT	0,138		1030,664		412,753	
[2]LPT	0,132	$0,134^A$	1003,075	1010^A	395,771	398^A
[3]LPT	0,133		994,816		386,841	
[1]LR	0,129		1115,531		585,979	
[2]LR	0,128	$0,129^A$	1072,752	1096^B	636,210	598^B
[3]LR	0,131		1100,259		573,178	

LL- Levedura lisa, LR- levedura rugosa, LPT – levedura do processo transformada, ART – Açúcar redutor total, AS- ácido succínico, AL- ácido láctico
1,2 e 3- triplicatas, *médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p ≤0,5) pelo teste de Tukey.
Fonte: Autora, 2018.

Tabela 9 - Valores das triplicatas para cada tipo de levedura e as respostas glicerol (%) , AA (ácido acético) ppm e etanol % (ET).

Ensaio	Glicerol ppm	*$média_{Glicerol}$	AA ppm	*$média_{AA}$	Rend ET (%)	*$média_{ET}$
[1]LL	1075,159		1155,957		9,269	
[2]LL	1082,343	1069^A	1652,499	1473^A	9,065	$9,10^A$
[3]LL	1050,305		1610,656		8,977	
[1]LPT	1072,935		1473,568		9,136	
[2]LPT	1061,128	1066^A	1449,492	1460^A	9,083	$9,10^A$
[3]LPT	1064,407		1457,934		9,093	
[1]LR	1029,567		1397,839		8,511	
[2]LR	1048,377	1033^B	1443,171	1388^A	8,479	$8,49^B$
[3]LR	1020,791		1324,234		8,489	

LL- Levedura lisa, LR- levedura rugosa, LPT – Levedura do processo transformada, ART – Açúcar redutor total, GL- Glicerol, AA- ácido acético, ET - etanol
1,2 e 3- triplicatas, *médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p≤0,5) pelo teste de Tukey
Fonte: Autora, 2018.

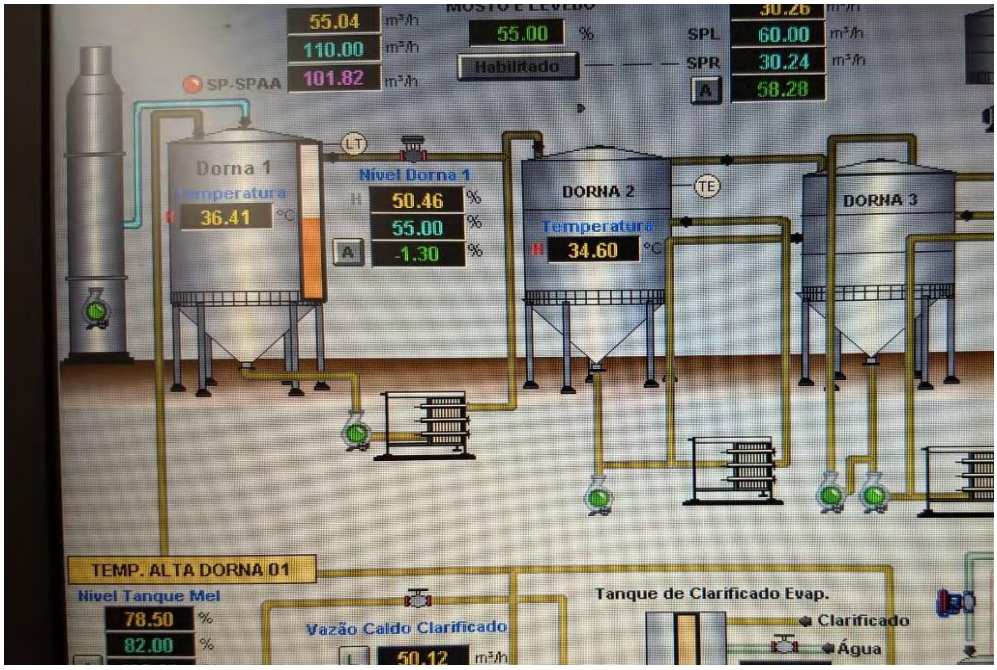
Na indústria 7,18% é muito significativo, ou seja, aumentar de 8,49% para 9,10% o rendimento de bioetanol, deste que o ART_i foi o mesmo.

5.3 Avaliação da aplicação da levedura do processo transformada (LPT) em fermentação em Escala industrial

A linhagem de levedura rugosa desestressada, denominada neste de estudo de levedura do processo transformada pelo Laboratório Microserv (denominada LPT) foi testada para a fermentação em escala industrial em uma usina da região de Pirassununga/SP no período da safra de cana de açúcar, com início de moagem em abril de 2018 e término em 22 de dezembro de 2018. Também foi inoculada a LPT de abril a setembro da safra de 2019. Foram coletadas amostras semanais de leveduras nas dornas de fermentação onde foram informadas as temperaturas das dornas. O material coletado foi analisado quanto a proporção de leveduras lisas e rugosas para avaliar o efeito do tempo de utilização do fermento e da temperatura das dornas sobre o estresse das leveduras.

A Figura 17 mostra as temperaturas no *display* do controle online que fica alocado na Destilaria. As temperaturas são controladas automaticamente, pois existem os sensores dentro dos tanques a 1/3 da altura do piso. Quando a água que refrigera não está a uma temperatura adequada, ou seja, em torno de 28ºC, a temperatura da fermentação (mosto mais fermento) atinge o valor de 36,41ºC na primeira dorna e 34,60ºC como se vê no *display*. As temperaturas acima de 32 graus são o ponto crítico para as leveduras lisas (LL) sofrerem alteração fenotípica de LL para leveduras rugosas (LR). A Usina em anos anteriores teve rendimentos etanólicos baixos por causa da LL que ser transformou em LR, no ano de 2018 começou a adquirir a levedura LPT, e foi observado que as LPT resistem mais tempo a este estresse térmico.

Figura 17 - Fluxograma da fermentação de uma fermentação industrial da usina estudada.



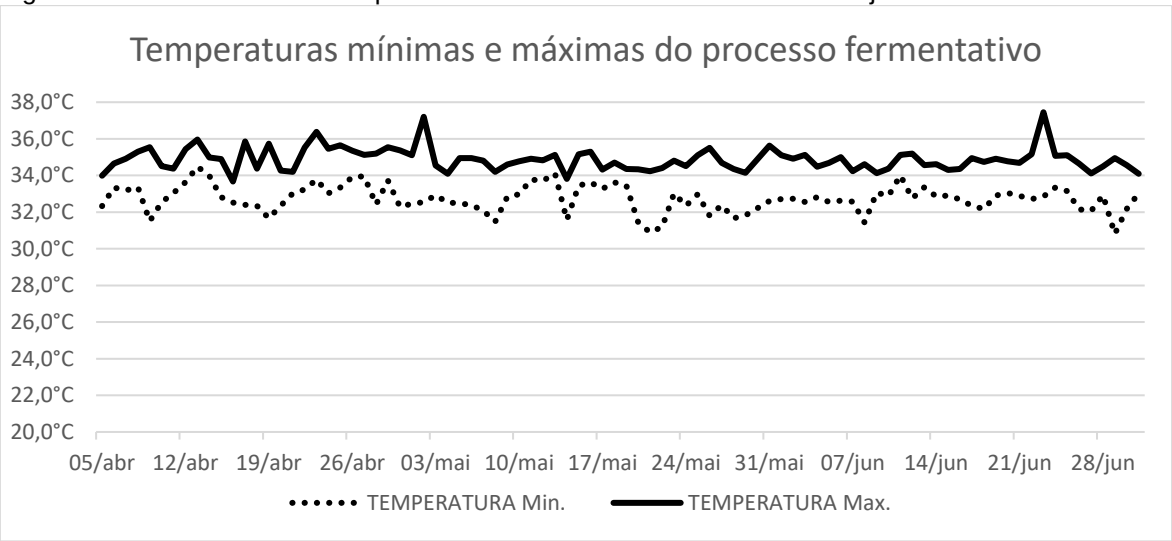
Fonte: Autora, 2018.

As temperaturas no processo industrial são geralmente acima de 32 graus, pela baixa eficiência da refrigeração. As baixas capacidades de troca térmica dos trocadores de calor acoplados aos tanques de fermentação são muito provavelmente devido à falha de projeto onde são subdimensionadas a quantidade de placas e a área de troca, bem pelo fato de ainda existirem usinas sem torres de refrigeração. Outro fato que constantemente se observa é a má qualidade da água de refrigeração onde forma filmes microbianos na superfície das placas e assim o coeficiente de confecção de temperatura é afetado. Outra dificuldade se trata da maneira como são feitas as limpezas destas placas, que geralmente são em grande número, por exemplo, 150 unidades. Estas placas são limpas manualmente uma a uma em aproximadamente três horas cada conjunto.

Trocadores de calor a placas são formados por pacotes de placas de inox, onde em um dos lados passa o mosto e do outro lado o material refrigerador em um fluxo turbulento. As placas são vedadas umas nas outras por perfis de borracha entre elas. Nos cantos das placas existem aberturas de passagens de líquido, que formam canais de distribuição onde a água fria é enviada em contra fluxo ao mosto quente ocorrendo o aquecimento da mesma pelo calor do mosto.

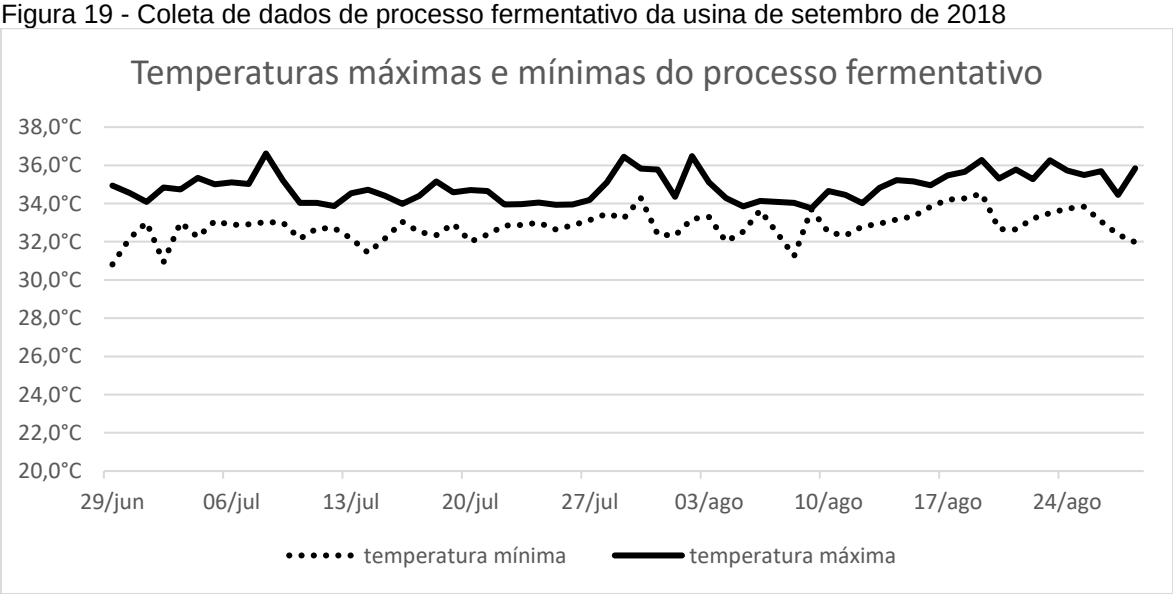
As Figuras de 18 a 21 mostram as temperaturas máximas e mínimas das dornas de fermentação dia a dia de toda a safra 2018. O que foi observado que em todos os dias a temperatura máxima ultrapassou o limite satisfatório. Muito provavelmente uma levedura comercial normal não teria resistido e se tornaria 100% rugosa, talvez como o ocorrido na safra 2017 da Usina, que foi necessário trocar o todo o fermento em setembro de 2017, como pode ser observado na Tabela 10.

Figura 18 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de abril a junho de 2018



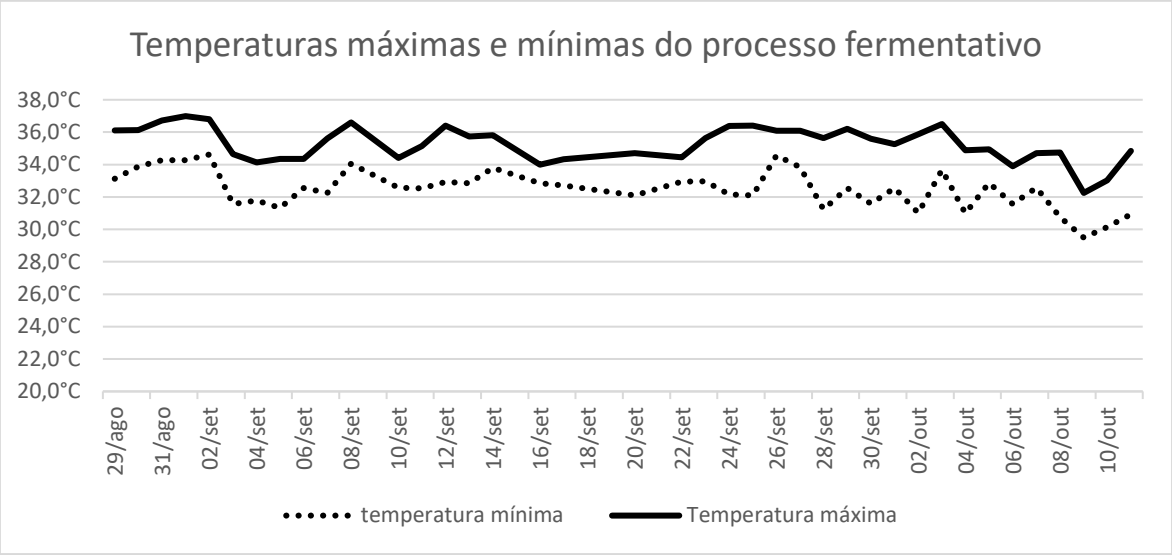
Fonte: Autora, 2018.

Figura 19 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de setembro de 2018



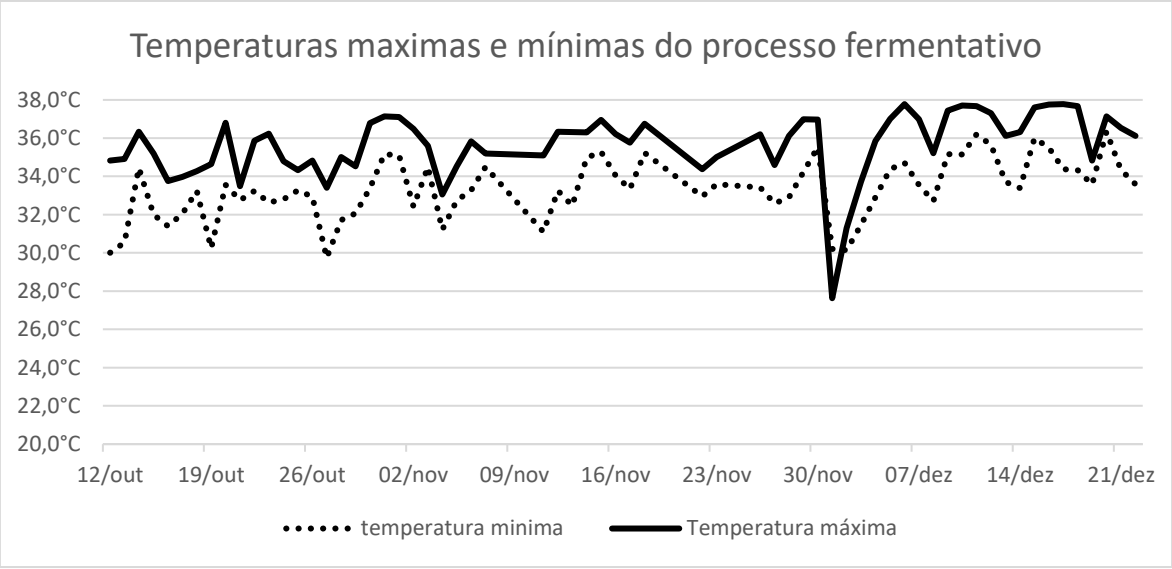
Fonte: Autora, 2018.

Figura 20 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina de setembro de 2018



Fonte: Autora, 2018.

Figura 21 - Coleta de dados de processo fermentativo da usina observada de outubro a dezembro de 2018

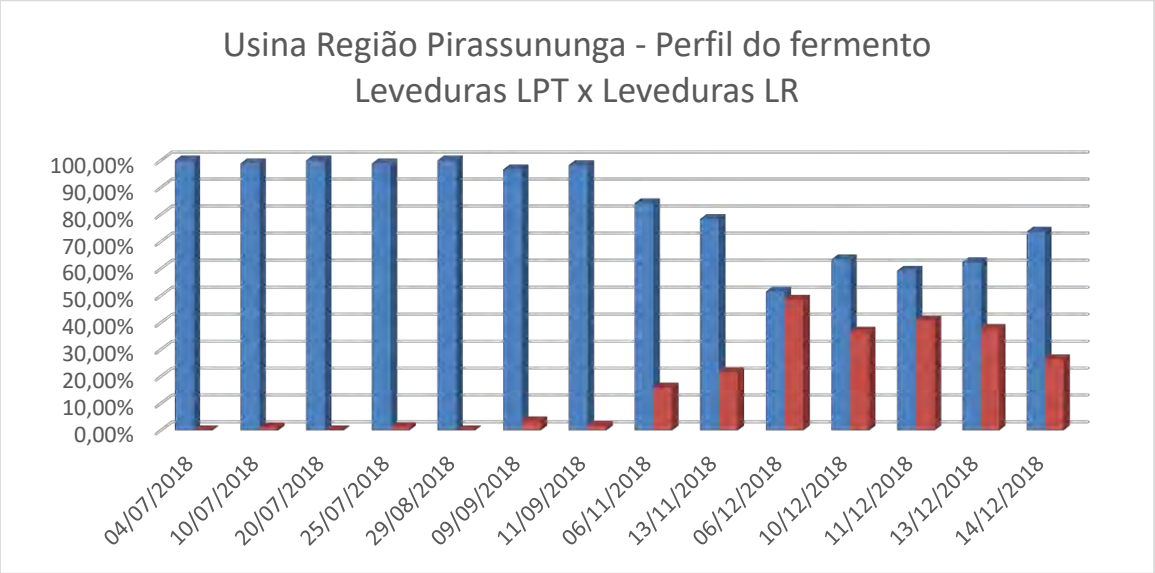


Fonte: Autora, 2018.

A Figura 22 apresenta a porcentagem de LPT e LR ao longo da safra 2018/2019, onde mostra um aumento de leveduras rugosas (LR) a partir do mês de novembro 2018, mesmo assim terminando a safra com 73,64% de leveduras LPT. Pelas temperaturas acima do limite observadas na figura 17 era para as leveduras terem ficado 100% LR logo no início da safra. Sugere-se maior estudo no comportamento na resistência ao estresse (transformação de LL para LR) das leveduras LPT quando no processo industrial.

O acompanhamento das porcentagens de leveduras do processo transformada (LPT) e levedura rugosa (LR) na fermentação ao longo da safra 2018 é apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Porcentagem de predominância safra 2018/2019



Fonte: Autora, 2018.

A Tabela 10 apresenta a contagem das placas de Petri conforme critério Figura 13 após crescimento em estufa durante 48 horas a 32 graus, resumo das 32 amostras coletadas. As amostras nos meses de abril, maio e junho as leveduras estiveram no processo 100% LL.

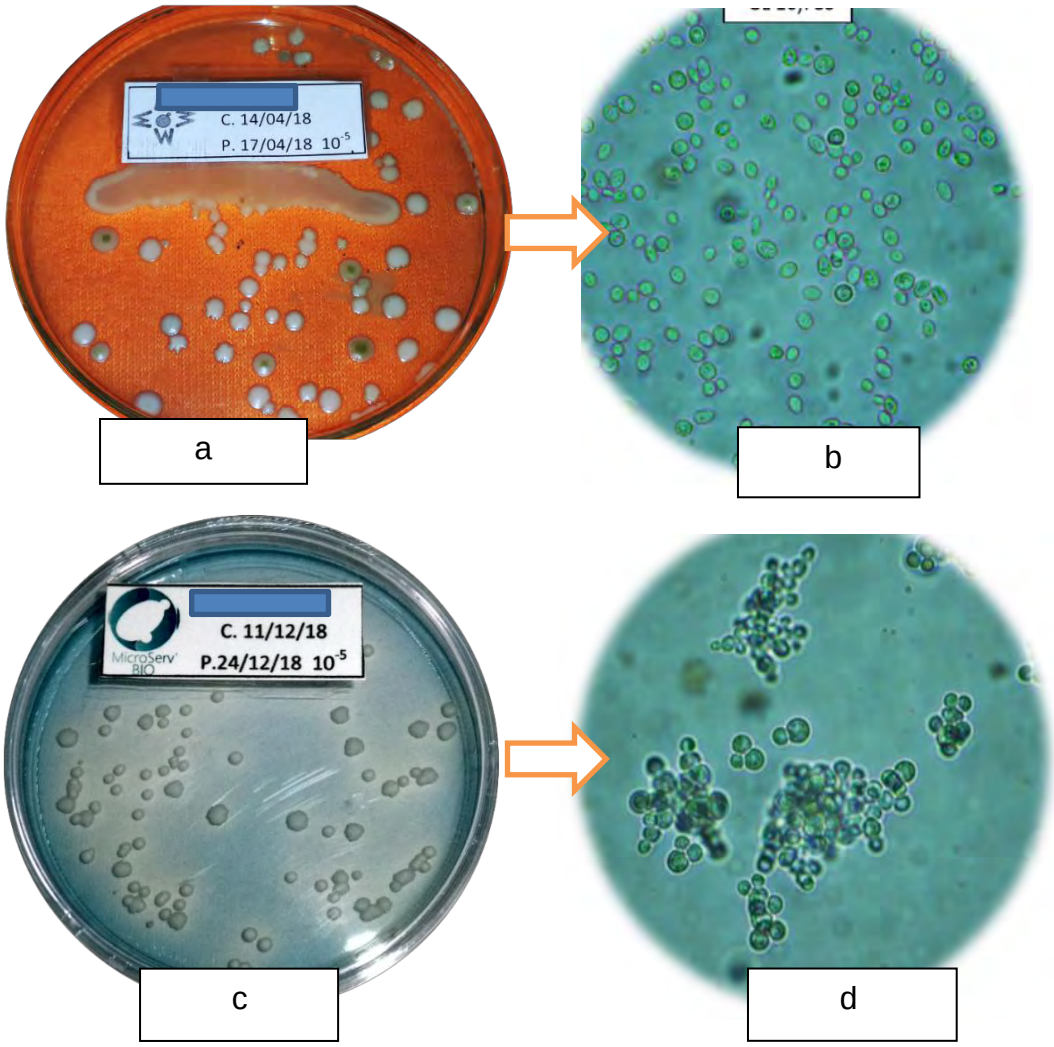
Tabela 10 - Acompanhamento das porcentagens de leveduras ao longo da safra 2018

levedura	04/07/18	10/07/18	20/07/18	25/07/18	29/08/18	09/09/18	11/09/18
LPT	100,00%	98,89%	100,00%	98,86%	100,00%	96,67%	98,27%
LR	0,00%	1,11%	0,00%	1,14%	0,00%	3,33%	1,73%
	06/11/18	13/11/18	06/12/18	10/12/18	11/12/18	13/12/18	14/12/18
LPT	84,15%	78,38%	51,50%	63,39%	59,23%	62,37%	73,65%
LR	15,85%	21,62%	48,50%	36,61%	40,77%	37,63%	26,35%

LPT- levedura do processo transformada, LR- levedura rugosa.
Fonte: Autora, 2018.

As Figuras 23 (a, b, c e d) mostram a população dos fenotípicos de leveduras de um processo fermentativo industrial da Usina, onde a fermentação foi iniciada com leveduras LPT (células soltas). A Figura 23 (a) são de colônias LPT que tem o fenótipo de aparência todas brilhantes e o resultado é 100% lisas; Figura 23 (b) se visualiza ao microscópio uma pequena porção da colônia que foi retirada com alça de platina e feito um esfregaço da levedura LPT fotografada em Microscópio com aumento de 400X, campo claro. A Figura 23 (c) mostra que as leveduras LPT continuam com 59,23% que são compostas de células soltas. Somente 40,77% se transformaram em rugosas após 8 meses no processo mesmo com a temperatura acima de 32ºC. A Figura 23 (d) mostra o formado de células aos cachos, que são onde os brotos não se desprendem da célula mãe no microscópio aumento de 400x.

Figura 23 - Fenótipos da levedura do processo industrial da Usina onde as fotografias ao microscópio foram tiradas com aumento de 400x.



Fonte: Autora, 2018.

A Figura 24 apresenta a placa de Petri com colônias em meio de cultura específico WLN, onde a própria coloração da levedura informa que muito provavelmente se trata da mesma levedura. As colônias menores ainda não se estressaram com a temperatura de fermentação acima de 32ºC. As colônias de leveduras foram cultivadas em meio de cultura nutriente WLN e os parâmetros utilizados para o distinção das colônias foram tamanho e perfil de cor.

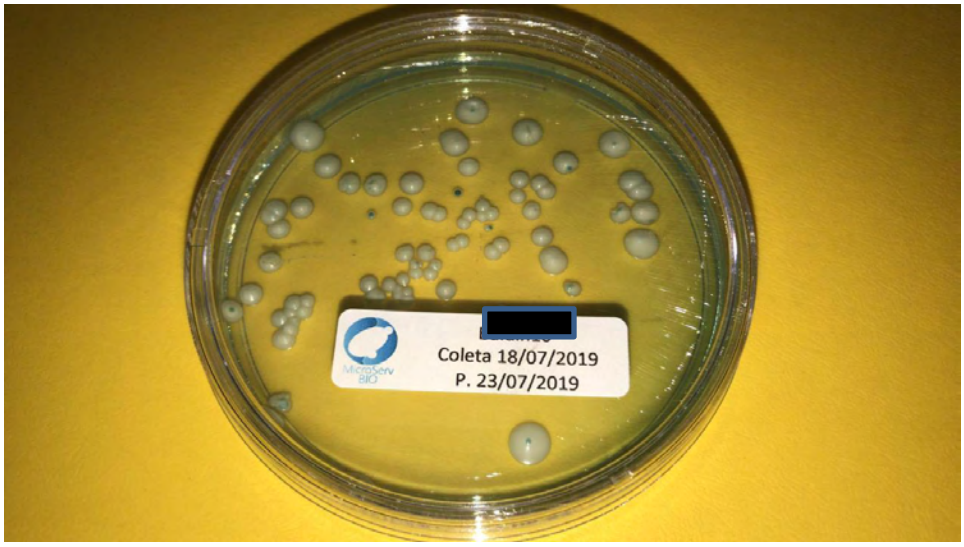
Figura 24 - Aspectos das colônias de leveduras do processo transformada (LPT) e leveduras rugosas (LR) em meio de cultura WLN

Fonte: Autora, 2018.

As colônias em forma de flor são de leveduras rugosas (LR) e as colônias menores são de leveduras lisas (LL).

E a Figura 25 mostra que mesmo em julho de 2018, após três meses de safra as leveduras se encontravam 100% lisas (LL), o que é muito raro nas unidades industriais.

Figura 25 - Placa de Petri com Leveduras 100% lisas (LPT) em meio WLN da Usina da pesquisa.



Fonte: Autora, 2019.

A Tabela 11 mostra dados da eficiência de fermentação (EF %) da Usina da região de Pirassununga. Na safra de 2017, não foi colocada a levedura LPT na fermentação, enquanto que nas safras seguintes 2018 e 2019 utilizou-se para iniciar a fermentação as leveduras do processo transformadas (LPT). Como pode ser observado que houve um aumento médio eficiência de fermentação na ordem de 4% na produção de etanol. Ressalta-se que na safra de 2017 a usina teve que trocar todo o fermento, pois a eficiência de fermentação (EF) diminuiu para 81,69% em setembro de 2017, por esta razão a EF aumentou de outubro a dezembro.

Eficiência de fermentação é a porcentagem de etanol produzido dividido pelo etanol provável calculado pelo ART enviado para a fermentação e multiplicado por 100.

Tabela 11 - Comparativo de Eficiência de Fermentação (EF %) por ano

Eficiência fermentação Industrial (EF%) por ano			
Mês	**2017**	**2018**	**2019**
Abril	82,59	89,70	90,17
Maio	83,59	89,91	90,64
Junho	83,44	90,33	90,20
Julho	83,35	89,05	89,63
Agosto	83,91	89,22	90,71
Setembro	81,69	89,93	88,29
Outubro	89,26	90,95	-
Novembro	90,74	88,28	-
Dezembro	97,06	88,64	-
MÉDIA	86,18	89,56	89,94
PORCENTAGEM DE AUMENTO		3,92	4,36

- Sem estes dados, pois usina ainda estava em moagem no período de escrita desta Dissertação.
Fonte: Autora, 2019.
.

A divergência dos resultados em escala laboratorial (acréscimo de 6,89% na produção quando a fermentação foi conduzida com leveduras LPT) e industrial (acréscimo de 4,17% na produção com fermentação com leveduras LPT) se deve muito provavelmente aos fatores de interferência no processo de produção industrial. Essas influências que rebaixam o resultado podem ser bactérias no processo fermentativo consumindo o substrato, demora no processo para a separação da levedura após fermentação, erros nas medições e amostragens e métodos, dentre outras interferências.

7 CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo foi possível verificar o efeito da utilização de leveduras rugosas desestressadas, convertidas para forma lisas, que se chamam leveduras do processo transformada denominadas LPT, no rendimento da produção de etanol:

- Escala laboratorial: aumento de 6,86%
- Escala industrial aumento de 4,17%

Com estes valores de rendimentos de etanol tanto em escala laboratorial e industrial percebe que a LPT impacta na produção de bioetanol sem alterar os insumos, equipamentos e estrutura física das usinas, assim se mostrando viável sua aplicação para tal finalidade. Este aumento de 4,17% em escala industrial representa um ganho econômico muito significativo devido ao volume de produção de bioetanol e margem de lucro nas usinas alcooleiras do Brasil.

8. REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. **Infecção na fermentação: como evitá-la**. STAB Álcool & Açúcar, Piracicaba, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. São Paulo: Fermentec, 448 p. 2005.

ATALA, D. I. P. **Fermentação alcoólica com alta densidade celular**: modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização de processo. 2000. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Araras: Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras, (Apostila do curso de treinamento unidades de Iguatemi-PR, Ivaré-PR, pertencentes à Usina de Açúcar Santa Terezinha Ltda), 2004.

BASSO, L. C. et al**. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil**. FEMS yeast research, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L. C. et al**. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica da cariotipagem**. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, Piracicaba, 1993. Anais… Piracicaba: Stab, p. 246-250. 1993.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. **Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol estresse responses of Saccharomyces cerevisiae**. Enzyme and Microbial Technology, Philadelphia, v. 88, p. 746-755, 1999.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA**. Portaria n. 75, de 5 de março de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 6 mar. 2015. Seção 1, p. 17. Disponível: <http://portal.imprensanacional.gov.br/consulta>. Acesso em: 30 jan. 2018.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. – V. 1 – Brasília: Conab, 2018- v. Quadrimestral Disponível em: http://www.conab.gov.br. Acesso 12 fev. 2018.

CONAB,https://www.**noticiasagricolas.com.br/noticias/sucroenergetico**/248913-conab-aponta-para-uma-producao-de-355-bilhoes-de-litros-de-etanol.html#.XfuA2GRKg2w acesso 19 dez 19.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. **Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica continua.** In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TECNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, Maceió, 1996. Anais... Maceió: p.23-29, STAB, 1996.

FERREIRA, R. J. A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica**. Apostila, Rio de Janeiro, p 73 ,2008.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos Avançados, São Paulo, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

JACOBEEN, S. et al. **Geometry, packing, and evolutionary paths to increased multicellular size.** Physical Review E, College Park, v. 97, n. 5, art. 050401, 2018.

MIKI, B.L.A. et al. **Possible Mechanism for Flocculation Interactions Governed by Gene FLO1 in Saccharomyces cerevisiae**, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, p. 878-889,1982.

MAGRO, F. G. et al. **Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 37, n. 1, p. 159-174, 2016

MUSSATTO, S, I. et al; **Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production**, Biotechnology Advances (2010) 817–830, 2010

IBB—Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, p 471, 2018.

OLIVÉRIO, J. L. **Brazilian sugar cane sector**: evolution, trends, sustainability. São Paulo, 2008.

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010.

PATERNINA, L.M.C. **Modelagem e simulação do processo de fermentação extrativa a vácuo com uma câmera de flash e separação do CO2 utilizando uma coluna de absorção**. Tese de Mestrado Campinas, SP, UNICAMP: [s.n.], 2011

ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, N.11; p.15, 2010.

RABOUILLE, C; ALBERTI, S **Cell adaptation upon stress: the emerging role of membrane-less compartments** Current Opinion in Cell Biology**,** 47:34–42, 2017

RATCLIFF, W. C. et al. **Origins of multicellular evaluability in snowflake yeast.** Nature Communications, London, v. 6, art. 6102, 2015.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

REIS, V. R. et al. **Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 268-274, 2017.

REIS, V. R. et al. **Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1121-31, 2013.

RODRIGUES, A. **Identificação e caracterização de genes e fatores relacionados à floculação e desenvolvimento de uma levedura industrial não floculante**. 2013. 165 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SOARES, E. V, **Flocculation in Saccharomyces cerevisiae: a review**. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 110, n. 1, p. 1-18, 2011.

SOUSA, D. D. P. et al. **Efeito de aditivo químico e inoculantes microbianos na fermentação e no controle da produção de álcool em silagens de cana-de-açúcar.** Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 37, n. 9, p. 1564-1572, 2008.

VILELA, P. R. C. **Modelagem, simulação e otimização dinâmica aplicada a um processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada**. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2015.

ZABED, H. et al. **Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Oxford, v. 71, p. 475-501, 2017.