

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GUSTAVO HUSEIN

Fermentação com alto teor alcoólico com e sem reciclo celular utilizando
hidrolisado de milho esterilizado por radiação ionizante

Piracicaba
2022

GUSTAVO HUSEIN

Fermentação com alto teor alcoólico com e sem reciclo celular utilizando hidrolisado
de milho esterilizado por radiação ionizante

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na
Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e
no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valter Arthur

Piracicaba

2022

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca – CENA/USP

Husein, Gustavo

Fermentação com alto teor alcoólico com e sem reciclo celular utilizando hidrolisado de milho esterilizado por radiação ionizante / Gustavo Husein; Valter Arthur. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

58 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Acelerador de partículas 2. Fermentação alcoólica 3. Reciclo de células 4. Grãos úmidos de destilaria (WDGS) 5. Very high gravity (VHG) I. Título.

CDU (663.252.4 + 544.543.7)

Elaborada por:

Marilia Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

À minha família, Aquel Husein Neto, Sandra Sachs Husein, Felipe Husein e Melina Prado, pelo suporte e companheirismo incondicional!

Ao meu orientador Prof. Dr. Valter Arthur por todo suporte e conselhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista por todo suporte durante a execução do meu mestrado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Apoio à Universidade de São Paulo (FUSP - (Processo nº 600101), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

HUSEIN, G. **Fermentação com alto teor alcoólico com e sem reciclo celular utilizando hidrolisado de milho esterilizado por radiação ionizante**. 2022. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

A presença de contaminação bacteriana é comum no processamento do etanol a partir de milho, já que o mosto não é esterilizado antes do processo, podendo causar redução da eficiência e produtividade. Além disso, outro fator importante na redução da produtividade do processo está relacionado à baixa concentração de células de leveduras, acarretando em maior tempo para o consumo do substrato e o crescimento do fermento. Visando aumentar a produtividade, as fermentações com alto teor de sólidos (VHG), com concentrações de açúcares superiores a 250 g.L^{-1} , foram implementadas, porém a alta pressão osmótica existente no início da fermentação e o alto teor alcoólico alcançado ao final do processo resultam em significativo estresse para as células de levedura. O objetivo do trabalho foi investigar a viabilidade de uma dada proposta tecnológica da aplicação do reciclo celular no processamento de etanol a partir de milho com alto teor alcoólico (VHG), utilizando alta densidade celular de inóculo e mosto esterilizado por radiação ionizante, assim como verificar a composição bromatológica dos grãos úmidos de destilaria com solúveis (WDGS) gerados no processo proposto, visando aumentar a produtividade do processo fermentativo e manter a qualidade nutricional do WDGS. Para isso, foi utilizado mosto na concentração de 258 g.L^{-1} de açúcares e redutores totais (ART) e a levedura *Thermosacc Dry* em duas concentrações iniciais, com 1 e 3% (m.v^{-1}) de células, realizando o reciclo celular integral e com retirada de 59,5 gramas por litro de células nos Tratamentos iniciados com 3% (m.v^{-1}) de inóculo, assim como uma fermentação controle com 1% (m.v^{-1}) de inóculo sem a realização de reciclo, totalizando três Tratamentos. Devido ao baixo crescimento celular e queda na viabilidade, somente um reciclo foi realizado, limitando o ensaio à dois ciclos fermentativos. As fermentações com 3% (m.v^{-1}) de inóculo e reciclo de células resultaram em maiores teores alcoólicos, com valores médios de $14,04 \pm 0,01 \text{ (v.v}^{-1}\text{)}$ e produtividade média no primeiro ciclo de $3,725 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $2,335 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no segundo ciclo, totalizando uma produtividade média em ambos os ciclos de $2,845 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto que o vinho proveniente da fermentação submetida ao Tratamento com 1% (m.v^{-1}) de inóculo e sem

reciclo de células alcançou um teor alcoólico de $13,73 \pm 0,01$ (v.v⁻¹) e produtividade de $2,66 \pm 0,01$ g.L⁻¹.h⁻¹. Em relação à composição do WDGS, a aplicação do reciclo e maior concentração de células inicial também promoveu influência positiva na qualidade nutricional do coproduto, independente da quantidade de células retirada entre os reciclos, com valor médio no conteúdo proteico de 15,125% (massa seca), contra 14,37% (massa seca) obtido no Tratamento com 1% (m.v⁻¹) de inóculo e sem reciclo de células. Conclui-se que a utilização de uma maior concentração inicial de células e a reutilização da levedura por mais um ciclo trouxeram benefícios tecnológicos para o processo de produção de etanol a partir de milho, aumentando a produtividade fermentativa e a qualidade nutricional do WDGS.

Palavras-chave: Acelerador de elétrons. Fermentação alcoólica. Reciclo de células. Hidrolisado de milho. Grãos úmidos de destilaria (WDG). Very high gravity (VHG).

ABSTRACT

HUSEIN, G. **Fermentation with high alcohol content with and without cell recycling using corn hydrolyzate sterilized by ionizing radiation.** 2022. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

The presence of bacterial contamination is common in ethanol processing from corn, as the corn mash is not sterilized before the process, which can reduce efficiency and productivity. Furthermore, another important factor in reducing the productivity of the process is related to the low concentration of yeast cells, resulting in a longer time and substrate consumption for yeast growth. Aiming to increase productivity, fermentations with high solids content (VHG), with sugar concentrations above 250 g.L⁻¹, were implemented, however the high osmotic pressure existing at the beginning of the fermentation and the high alcohol content reached at the end of the process results in significant stress to the yeast cells. The objective of this work was to investigate the viability of a technological proposal for the application of cell recycling in the processing of ethanol from corn with high alcohol content (VHG), using high inoculum cell density and mash sterilized by ionizing radiation, as well as verifying the chemical composition of wet distillery grains with solubles (WDGS) generated in the proposed process, aiming to increase the productivity of the fermentation process and maintain the nutritional quality of the WDGS. For this, mash was used at a concentration of 258 g.L⁻¹ of total reducing sugars (TRS) and the yeast *Thermosacc Dry* at two initial concentrations, with 1 and 3% (m.v⁻¹) of cells, performing the complete cell recycling and removing 59.5 grams per liter of cells in the Treatments started with 3% (m.v⁻¹) of inoculum, as well as a control fermentation with 1% (m.v⁻¹) of inoculum without recycling, totaling three Treatments. Due to low cell growth and drop in viability, only one cycle was performed, limiting the assay to two fermentation cycles. Fermentations with 3% (m.v⁻¹) of inoculum and cell recycling resulted in higher alcohol content, with average values of 14,04 ±0,01 (v.v⁻¹) and average productivity in the first cycle of 3,725 ±0,07 g.L⁻¹.h⁻¹ and 2,335 ±0,04 g.L⁻¹.h⁻¹ in the second cycle, totaling an average productivity in both cycles of 2,845 ±0,01 g.L⁻¹.h⁻¹, while that the wine from fermentation submitted to Treatment with 1% (m.v⁻¹) of inoculum and without cell recycling reached an alcohol content of 13,73 ±0,01 (v.v⁻¹) and productivity of 2,66 ±0,01 g.L⁻¹.h⁻¹. Regarding the composition of the WDGS, the application of recycling and higher

concentration of initial cells also promoted a positively influence on the nutritional quality of the co-product, regardless of the amount of cells removed between recycles, with an average protein content of 15,125% (dry mass), against 14,370% (dry mass) obtained in the Treatment with 1% (m.v⁻¹) of inoculum and without cell recycling. In conclusion, the use of a higher initial concentration of cells and the reuse of yeast for another cycle brought technological benefits to the ethanol production process from corn, increasing the fermentative productivity and nutritional quality of WDGS.

Keywords: Electron Accelerator. Alcohol Fermentation. Cell recycling. Corn mash. Wet Distillery Grains (WDG). Very high gravity (VHG).

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	15
3.	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1.	PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MILHO	16
3.2.	COPRODUTOS DOS GRÃOS DE DESTILARIA	17
3.3.	FERMENTAÇÃO COM ALTO TEOR DE SÓLIDOS (VHG)	17
3.4.	RECICLO DE CÉLULAS	18
3.5.	CONTAMINAÇÃO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	19
3.6.	METABÓLITOS INDICADORES DE ESTRESSE	20
3.7.	RADIAÇÃO E SEUS EFEITOS SOBRE OS CARBOIDRATOS E MICRORGANISMOS	21
3.8.	ESTERILIZAÇÃO DO MOSTO	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1.	LOCAIS DE EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO	24
4.2.	MATERIAL	24
4.3.	PREPARO DO MATERIAL	24
4.3.1.	MOAGEM	24
4.3.2.	LIQUEFAÇÃO DO AMIDO	24
4.3.3.	SACARIFICAÇÃO DO AMIDO	24
4.3.4.	PREPARO DO MOSTO	25
4.4.	ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO POR FEIXES DE ELÉTRON	25
4.4.1.	PREPARO DO MATERIAL A SER ESTERILIZADO	25
4.4.2.	TRATAMENTO POR FEIXE DE ELÉTRONS	25
4.5.	ENSAIO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	26
4.5.1.	TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS	26
4.5.2.	ATIVAÇÃO DA LEVEDURA	27
4.5.3.	CONDIÇÕES FERMENTATIVAS	27
4.5.4.	ACOMPANHAMENTO DA FERMENTAÇÃO	27
4.6.	PARÂMETROS AVALIADOS	28
4.6.1.	VIABILIDADE CELULAR	28
4.6.2.	TEOR ALCOÓLICO	28
4.6.3.	RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE DA FERMENTAÇÃO	29
4.6.4.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E GLICEROL	29

	11
4.6.5. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO VINHO	30
4.6.6. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE TREALOSE	30
4.6.7. BIOMASSA DE LEVEDURA APÓS O RECICLO	31
4.6.8. ANÁLISE BROMATOLÓGICA DO WDG	31
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS	33
5.1. CRESCIMENTO E VIABILIDADE CELULAR	33
5.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	36
5.3. DESPRENDIMENTO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO ₂)	38
5.4. METABÓLITOS ASSOCIADOS À FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	39
5.5. GRÃOS ÚMIDOS DE DESTILARIA COM SOLÚVEIS (WDGS)	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de energia, combinada com a consciência da escassez (EHSAN et al., 2013) e potencial poluente dos combustíveis fósseis (LIU et al., 2007) tornaram de extrema necessidade o estudo e descobrimento de novas fontes energéticas renováveis, ganhando destaque neste cenário o bioetanol (PEREIRA et al., 2019). No Brasil, a principal fonte vegetal para a produção de etanol carburante é a cana-de-açúcar, porém esta já apresenta limitações quanto ao seu ciclo vegetativo e tempo de estocagem (LOPES et al., 2016), tornando o milho uma alternativa viável em alguns estados do país.

A produção de etanol a partir do milho já é bastante consolidada no mundo, sendo os Estados Unidos o maior produtor (GRAY et al., 2006), com produção estimada pela U.S. Energy Information (EIA, 2021) de 66,5 bilhões de litros no ano de 2021, enquanto que no Brasil, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2021), a estimativa para a safra 2021/22 será de 3,47 bilhões de litros, com elevação de 14,9%, em relação a safra anterior.

O processamento do etanol a partir do milho consiste em diversas etapas consecutivas, passando pela conversão do amido presente nos grãos de milho em açúcares fermentáveis até a fermentação destes realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SHARMA et al., 2016), gerando ao final do processo principalmente etanol e grãos úmidos de destilaria (WDG) (VERACINI et al., 2013), coproduto aplicado na produção animal com alto valor agregado (KUMAR; SINGH, 2018). Visando o incremento da estabilidade, além de maior facilidade de transporte e armazenamento, o WDG costuma ser concentrado, sendo nomeado como grãos secos de destilaria (DDG).

Com o objetivo de reduzir os custos e o impacto ambiental, além de intensificar a produtividade do processo, a concentração de etanol ao final do processo deve ser aumentada, reduzindo o consumo de água para preparo do mosto e energia requerida na destilação (MADSON, 2009). Neste sentido, as fermentações com alto teor de sólidos (VHG), com concentrações de açúcares superiores a 250 g.L⁻¹, foram desenvolvidas (THOMAS et al., 1993). No entanto, fermentações VHG resultam em significativo estresse para a levedura no processo devido à pressão osmótica existente no início da fermentação e do alto teor alcoólico alcançado ao final do processo (PULIGUNDLA et al., 2019).

A geração de etanol a partir do milho apresenta como vantagens em relação a cana-de-açúcar: maior amplitude de climas que permitem o crescimento do milho (CONTINI

et al., 2019); maior rendimento por tonelada, com uma média de 420 litros para o milho e 85 litros para a cana (BOTHAST; SCHLICHER, 2005); menor concorrência com o mercado de açúcar (IGLESIAS; SESMERO, 2015); além da possibilidade de armazenamento do milho por maiores períodos sem alterar a qualidade da matéria-prima a ser fermentada posteriormente (CORADI et al., 2014). Porém, a geração de etanol tendo o milho como substrato é um processo mais longo, com duração média de 48 a 72 horas (REIS; RAJENDRAN; HU, 2017).

Como forma de reduzir o tempo despendido e aumentar a eficiência do processo fermentativo, realizou-se a introdução do reciclo de células a partir da incorporação do processo Melle-Boinot nas destilarias de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil (KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2001). A recuperação das leveduras por centrifugação permitiu o aumento na produtividade e rendimento da fermentação ao operar em alta densidade celular (YAMAKAWA et al., 2016), reduzido tempo de fermentação (BASSO et al., 2008) e consumo de açúcar e nutrientes para a propagação celular (BRETHAUER; WYMAN, 2010).

A utilização do reciclo no processo de obtenção de etanol a partir da cana-de-açúcar foi de extrema importância para o aumento da produtividade do processo industrial (RAGHAVENDRAN et al., 2017), porém esta recirculação das leveduras pode causar o acúmulo de contaminação, o que interfere no consumo de açúcares e, portanto, no rendimento do processo (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). Bactérias lácticas, acéticas e leveduras selvagens são os organismos contaminantes mais encontrados (INGLEDEW; LIN, 2011), sendo que estes microrganismos, a partir da produção de metabólitos e competição pelo substrato e micronutrientes (SKINNER; LEATHERS, 2004), são responsáveis por um decréscimo considerável na produtividade industrial (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Visando a redução da contaminação microbiológica, antibióticos e outros agentes químicos são recorrentemente utilizados (INGLEDEW; LIN, 2011), porém estes produtos apresentam alto custo (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003) e podem gerar problemas na fermentação ou até mesmo microrganismos resistentes (CECCATO-ANTONINI, 2018). Além destes fatores, existe uma pressão para se reduzir a administração destes compostos químicos pois o seu uso impede a comercialização dos subprodutos advindos das leveduras secas, já que os mesmos ficam retidos nas células (LOPES et al., 2016).

As radiações ionizantes já obtiveram sucesso quando utilizadas para controle de microrganismos em soluções açucaradas aplicadas a fermentações (SAMUTA; ARAMAKI; HASHIZUME, 1997), sendo uma opção interessante para o processamento do mosto (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003). Além do controle da contaminação, o uso de radiação ionizante também poderia contribuir para a redução do custo e tempo despendido com o reciclo de células a partir da diminuição ou até mesmo interrupção do uso de tratamento ácido no fermento (NOLASCO JUNIOR, 2010), minimizando o estresse e a redução da viabilidade celular das leveduras (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). Com isto, seria possível a utilização de uma maior concentração de células no processo, contribuindo para o incremento da produtividade e da qualidade do WDG, pois as leveduras apresentam uma composição média de 39,6% de proteína (massa seca), e o direcionamento dessas células para a composição do WDG trariam impactos positivos principalmente na composição do teor proteico deste coproduto (YAMADA; SGARBIERI, 2005).

Por esses motivos, o presente trabalho teve por objetivo estudar a viabilidade da implantação do reciclo das células em mosto de milho com alta concentração de sólidos e esterilizado por radiação ionizante, avaliando o efeito da implementação dessa tecnologia na redução do tempo e produção de etanol a partir de milho e investigando os efeitos da adoção dessa tecnologia sobre a qualidade do WDG gerado no processo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar a viabilidade de uma dada proposta tecnológica da aplicação do reciclo celular no processamento de etanol a partir de milho com alto teor alcoólico (VHG), utilizando alta densidade celular de inóculo e mosto esterilizado por radiação ionizante; Também teve por objetivo verificar a qualidade bromatológica do WDGS gerado no processo proposto, visando aumentar a produtividade do processo fermentativo e manter a qualidade nutricional do WDGS.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Produção de etanol a partir de milho

Etanol pode ser produzido a partir da fermentação de açúcares provenientes de diversas fontes biológicas, os quais costumam ser separadas em três categorias: açúcar, amido e biomassa celulósica. A produção a partir de açúcar e amido é usualmente nominada de etanol de primeira geração, enquanto que a geração a partir de biomassa é referenciada como etanol de segunda geração (KUMAR; SINGH, 2019).

Diferentemente de combustíveis a base de petróleo, o etanol consiste em uma substância de componente puro, sendo comercializado na forma anidra ou hidratada. Álcoois são definidos pela presença de um grupo hidroxila (OH) ligado a um átomo de carbono, sendo a estrutura molecular do etanol C_2H_5O (HANSEN et al., 2010).

A produção de etanol utilizando o milho é realizada convencionalmente a partir de dois processos, a moagem úmida e seca, sendo estes processos distintos pois na moagem úmida ocorre o fracionamento do milho em seus componentes base, sendo que apenas o amido é utilizado na produção de etanol, enquanto que na moagem a seco, todo o milho é utilizado e os constituintes não açucarados são recuperados no final do processo na forma de coproduto (KUMAR; SINGH, 2019).

A escolha de qual forma de processamento ocorre a partir da distinção de qual é o principal objetivo industrial para o processamento do milho. Caso seja requerido um maior retorno financeiro por litro de etanol produzido, deve-se optar pelo processamento a seco, porém o processamento a seco atua como uma biorefinaria, permitindo a obtenção de diversos componentes valiosos do grão de milho (BOTHAST; SCHLICHER, 2005). O processo de moagem úmida é mais intenso energeticamente e financeiramente, sendo por esta razão menos utilizados pela maioria dos produtores de etanol, representando em 2016 apenas 10% da produção industrial dos Estados Unidos (RFA, 2017).

No processamento pelo método de moagem seca, inicialmente o milho limpo é moído e misturado com água (REIS; RAJENDRAN; HU, 2017). Enzimas α -amilase (EC 3.2.1.1) são adicionadas para iniciar a hidrólise do amido em dextrina, formando o dextrinizado, o qual é aquecido e pressurizado para facilitar a ruptura e gelatinização dos grânulos de amido e reduzir o crescimento de bactérias contaminantes. O particulado liquefeito cozido passa pela etapa de sacarificação, na qual enzimas glucoamilase (EC 3.2.1.3)

são adicionadas, realizando a conversão da dextrina em glicose (KUMAR; SINGH, 2019), açúcar o qual será convertido pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em álcool, dióxido de carbono e outros elementos (BOTHAST; SCHLICHER, 2005).

A fermentação dos açúcares pode ser operada em batelada com ciclos de 48 a 72 horas e entre 30 e 35°C, resultando em fermentado contendo 16% de etanol (v.v⁻¹), sólidos não fermentáveis e células de levedura. Esta mistura é destilada obtendo uma concentração de 95,6% de etanol em uma mistura azeotrópica com a água, podendo ser obtido etanol anidro após separação molecular da água e do etanol (REIS; RAJENDRAN; HU, 2017).

3.2. Coprodutos dos grãos de destilaria

Concomitantemente à geração de etanol, as indústrias realizam a recuperação e manipulação dos coprodutos da fermentação do milho. Para cada 100 kg de milho são gerados aproximadamente 30 kg de DDG e 2,8 kg de óleo de milho (BOTHAST; SCHLICHER, 2005). No processo de moagem seca, após a destilação ocorre a separação de toda fração não alcoólica, recebendo o nome de vinhaça, contendo fibras, óleos, proteínas e o amido não fermentado, o qual é processado para formar uma mistura nomeada de grãos úmidos de destilaria (WDG), sendo este um produto de alto valor agregado devido à sua aplicabilidade como alimentação animal (KUMAR; SINGH, 2019).

Visando o incremento da estabilidade, além de maior facilidade de transporte e armazenamento, o WDG costuma ser concentrado, sendo nomeado como grãos secos de destilaria (DDG), contendo entre 10 e 12% de umidade, sendo este produto responsável por um terço do faturamento industrial (REIS; RAJENDRAN; HU, 2017).

3.3. Fermentação com alto teor de sólidos (VHG)

A fermentação com alto teor alcoólico constitui-se como uma fermentação realizada em meio com concentração de sólido superior a 250 g.L⁻¹, o que permite uma alta concentração de álcool no final da fermentação devido à maior disponibilidade de substrato, obtendo vinhos com teores alcoólicos superiores à 15% (v.v⁻¹), além de necessitar menor demanda de energia e água no processamento. Contudo, este processo implica em períodos prolongados de cultivo e maior chance de aparecimento de fermentações incompletas

resultantes da geração de produtos inibitórios, alta pressão osmótica e nutrição inadequada (BARBER et al., 2002).

Devido à alta concentração de sólidos, as células de levedura são submetidas à alta pressão osmótica no início da fermentação, devido ao nível elevado de açúcar no meio. Com o desenvolvimento da fermentação e a conversão dos açúcares em etanol, as leveduras são expostas ao final do processo fermentativo à altos teores alcoólicos, reduzindo o crescimento e aumentando a perda de viabilidade celular (PULIGUNDLA et al., 2019).

Como forma de controle do processo e redução dos efeitos adversos ao microrganismo fermentador, recomenda-se a administração controlada de pequenas quantidades de acetaldeído durante a fermentação, reduzindo o tempo de fermentação e facilitando a recuperação do balanço redox intracelular (BARBER et al., 2002). Além disso, as operações em modo contínuo permitem uma melhor performance nas fermentações com alto teor de sólidos (ZHAO; LIN, 2003).

Para se obter altas concentrações alcólicas (JONES; INGLEDEW, 1994) e economia no uso de água (THOMAS et al., 1996) é importante se realizar como pré-tratamento a perolização por abrasão, processo que remove parte da matéria seca do grão e, conseqüentemente, aumenta a concentração do conteúdo de amido, facilitando que o processo com alta concentração de sólidos seja alcançado e permitindo que consiga-se um aumento de até 64% na concentração de álcool em comparação à grãos não perolados em fermentações convencionais (WANG et al., 1999).

A obtenção de fermentações com alto teor alcoólico é atrativa pois nestas condições é possível reduzir os custos e o impacto ambiental ao diminuir o consumo de água para preparo do mosto e energia requerida na destilação (MADSON, 2003), já que 30% do consumo energético necessário para o processamento do etanol se encontra na destilação (PULIGUNDLA et al., 2019). Porém, o alto teor de sólidos no início do processo e o alto teor alcoólico ao final resultam em uma limitação para a utilização desta tecnologia, exigindo que estes desafios sejam superados para que se obtenha uma fermentação mais sustentável e longa (BASSO et al., 2003, BAI et al., 2004).

3.4. Reciclo de células

Com o objetivo de aumentar a eficiência da fermentação, o processo Melle-Boinot foi introduzido nas destilarias de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar (KOSARIC;

VARDAR-SUKAN, 2001). A característica mais importante deste processo é a separação da porção alcoólica do creme de leveduras ao final da fermentação a partir do uso da centrifugação, permitindo a reutilização das células de levedura no próximo ciclo fermentativo (ZANIN et al., 2000).

A recuperação das leveduras por centrifugação permitiu o aumento na produtividade e rendimento da fermentação a partir da operação e manutenção de alta concentração celular (ASAKURA; TODA, 1991; YAMAKAWA et al., 2016), causando uma redução significativa no tempo de fermentação de até 7 vezes ao tempo tradicional (SARKS et al., 2014; BASSO et al., 2008) e diminuindo o consumo de açúcar e nutrientes para a propagação celular (BRETHAUER; WYMAN, 2010), possibilitando melhor disponibilidade dos açúcares para a fermentação (IENCZAK; GONÇALVES; JM, 2016). Por estes motivos, o reciclo de células constitui-se como uma forma eficiente de manter uma densidade celular suficiente e uma fermentação satisfatória (JIN et al., 2019).

3.5. Contaminação na fermentação alcoólica

Por se tratar de um processo não asséptico e pelo fato de o mosto não ser usualmente esterilizado (STUPIELLO; HORII, 1981), o aparecimento de contaminação e crescimento de diversos microrganismos é favorecido durante o processamento do etanol (NGANG et al., 1990).

Bactérias lácticas, acéticas e leveduras selvagens são os organismos contaminantes mais encontrados (INGLEDEW; LIN, 2011), com o gênero *Bacillus* e *Lactobacillus* aparecendo como o principal gênero dentre as bactérias gram-positivas encontradas nas fermentações alcoólicas.

Estes microrganismos, a partir da produção de ácido láctico e acético e competição pelo substrato e micronutrientes (SKINNER; LEATHERS, 2004), são responsáveis por um decréscimo considerável na produtividade industrial (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011), assim como pela redução da viabilidade das células de levedura a partir da lise celular (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006) e aumento do fenômeno de floculação (CHERUBIN, 2003; RAVNÖ; PURCHASE, 2005). Além disso, a presença de bactérias contaminantes está relacionado ao aumento da viscosidade do mosto a partir da produção de polissacarídeos, reduzindo a eficiência industrial (AMORIM; OLIVEIRA; CAMPOS, 1981; GRAVES et al., 2006).

Visando a redução da contaminação microbiológica, antibióticos e outros agentes químicos são recorrentemente utilizados (INGLEDEW; LIN, 2011), porém estes produtos apresentam alto custo (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003) e podem gerar problemas na fermentação ou até mesmo microrganismos resistentes (CECCATO-ANTONINI, 2018). Além destes fatores, existe uma pressão para se reduzir a administração destes compostos químicos pois o seu uso impede a comercialização dos subprodutos advindos das leveduras secas, já que os mesmos ficam retidos nas células (LOPES et al., 2016).

3.6. Metabólitos indicadores de estresse

Durante a fermentação alcoólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é exposta a diversas condições estressantes, como alta temperatura, elevado conteúdo de açúcares e alto teor alcoólico, afetando a viabilidade e eficiência fermentativa deste organismo. Em resposta à estas condições, as leveduras passam por mudanças internas dinâmicas, compreendendo a ativação de genes e produção de proteínas e outros metabólitos (BELLOCH et al., 2008).

Dentre estas alterações, a produção de trealose e glicerol é recorrentemente retratada, formando dois dos principais metabólitos gerados como resposta às condições estressantes, atuando como protetores que são acumulados durante à exposição.

A trealose é um dissacarídeo não redutor encontrado no citosol tanto de procaríotos quanto de eucariotos (THEVELEIN, 1984). A concentração de trealose varia muito dependendo da linhagem e das condições de cultivo, com valores representando menos de 1% a até mais de 25% do peso seco da levedura (HOHMANN, 2002). Este carboidrato de reserva é acumulado pelas células de *Saccharomyces cerevisiae* quando expostas em condições estressantes, como alto teor alcoólico, estresse osmótico e temperatura, apresentando uma função muito importante para a manutenção, diferenciação e sobrevivência destes organismos (PANEK et al., 1990). As moléculas de trealose realizam tais funções ao interagir com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas da membrana plasmática, substituindo a água que seria perdida em condições estressantes e, com isso, mantendo a integridade e fluidez da membrana, aumentando a viabilidade das células. Por este motivo, células produtoras de maiores quantidades de etanol costumam possuir maiores concentrações iniciais de trealose (D'AMORE et al., 1991).

Assim como a trealose, o glicerol é outro metabólito produzido por diversos organismos e que tem sua concentração aumentada em condições de estresse, principalmente devido à pressão osmótica elevada (BLOMBERG, 2000). Este metabólito atua na manutenção

do balanço redox e o acúmulo intracelular desta molécula desempenha um papel fundamental para a redução do estresse hiperosmótico (MICHNICK et al., 1997), minimizando a desidratação celular em ambientes com estresse osmótico intenso (PULIGUNDLA et al., 2011; MA; LIU, 2010). O glicerol é produzido durante a fermentação alcoólica, na qual a levedura converte a glicose em etanol e dióxido de carbono, assim como produz alguns metabólitos, sendo o glicerol o principal (ARRUDA, 2007). Dessa forma, o aumento na geração de glicerol está relacionado a redução na produção de etanol, diminuindo a eficiência fermentativa, já que ambos participam da mesma via bioquímica (BASSO et al., 1996).

3.7. Radiação e seus efeitos sobre os carboidratos e microrganismos

A energia eletromagnética que mantém as partículas atômicas unidas é denominada irradiação. Energia suficiente para causar a movimentação de um átomo para outra molécula mas não suficiente para alterá-la quimicamente, recebe o nome de radiação não ionizante, enquanto que a energia capaz de quebrar as ligações químicas é denominada radiação ionizante, permitindo que um elétron seja retirado do átomo e formando partículas com desequilíbrio entre o número de prótons no núcleo e elétrons nos orbitais, denominadas íons ou radicais livres (HENRY, 2009).

Três tipos de radiação ionizante são utilizadas em processos comerciais, a radiação gama de alta energia, raios X e os elétrons acelerados. Para a produção de tais radiações diferentes equipamentos ou fontes são utilizadas, sendo que para a produção de raios gama utilizam-se isótopos radioativos, como o Cobalto 60 e Césio 137, enquanto que os feixes de elétrons e raios X são gerados a partir de aceleradores, como os aceleradores lineares ou geradores Van de Graaff até velocidade próxima da luz (RIGANAKOS, 2010).

Ao interagir com a matéria, a energia gerada a partir da radiação ionizante é absorvida e redistribuída entre os átomos e moléculas, produzindo diversas espécies, entre elas os radicais livres H^+ e OH^- , os quais são altamente reativos e são capazes de causar alterações nas moléculas, formando moléculas ativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ozônio (O_3), produtos de extrema importância para a desinfecção (RELA, 2003).

A radiação é capaz de inativar os microrganismos ao causar danos em seus elementos celulares críticos, principalmente em seu material genético, sendo que estes danos podem ocasionar desde a perda de funções, como multiplicação celular, ou até mesmo levar a morte. As alterações do material genético podem acontecer como resultado de uma colisão direta

com a radiação, ou indireta pela interação da radiação ionizante com uma molécula adjacente, em geral a água, a qual acaba reagindo com o material genético (MOLINS, 2001).

Os carboidratos irradiados sofrem alterações a partir de hidrólise e oxidação, gerando compostos mais simples (FILHO et al., 2012), já que acredita-se que as ligações glicosídicas são especialmente sensíveis à radiação ionizante (WOLFROM; BINKLEY; MCCABE, 1959). Além da geração de açúcares mais simples, as alterações causadas nos carboidratos podem torná-los mais sucessíveis ao ataque enzimático (KILCAST, 1991), porém sem alterar as concentrações de açúcares presentes no mosto irradiado (SILVA, 2019).

3.8. Esterilização do mosto

Por se tratar de um processo não asséptico, a produção de bioetanol é conduzida na presença de contaminantes bacterianos e leveduras selvagens, representando em alguns casos até 30% da biomassa total da fermentação (ELSZTEIN; DE MENEZES; DE MORAIS, 2008).

Visando a esterilização do mosto, diversas abordagens são propostas para se realizar uma redução na diversidade microbiológica do mosto, sendo as mais utilizadas o tratamento ácido, o qual causa redução da viabilidade celular das leveduras de interesse (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991), e o tratamento com antibióticos, sendo que este está associado a altos custos de aplicação e geração de problemas por serem substâncias residuais (NOLASCO JUNIOR, 2005).

As radiações ionizantes já obtiveram sucesso quando utilizadas para controle de microrganismos em soluções açucaradas aplicadas a fermentações (SAMUTA; ARAMAKI; HASHIZUME, 1997), sendo uma opção interessante para o processamento do mosto (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003). O uso de aceleradores de elétrons nas usinas de processamento do etanol é favorecido pois é uma tecnologia simples, atua com um sistema liga/desliga e as usinas apresentam um superavit energético, permitindo que parte desta energia seja destinada para o funcionamento do acelerador de elétrons (ALCARDE; MARCOS; WALDER, 2001; PODADERA, 2007; RELA, 2003; CERVI et al., 2019).

Silva (2019) observou que ao tratar o mosto de cana com radiação ionizante na dose de 10 kGy houve uma redução na contagem de microrganismos totais de $4,5 \cdot 10^3$ UFC.ml⁻¹, enquanto que Costa et al. (2018), utilizando o tratamento convencional com ácido sulfúrico pH 2,0-3,0 e repouso de 1-2 horas, obteve uma redução de apenas $1,7 \cdot 10^2$ UFC.ml⁻¹. Calegari

(2021) observou em seu estudo que a dose de 20 kGy foi responsável pela maior produtividade e rendimento fermentativo, indicando a possibilidade da utilização dos irradiadores de elétrons no tratamento do mosto fermentativo como uma alternativa para redução da contaminação microbiana, além da possibilidade de promover um incremento na produtividade e rendimento do processo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de execução do experimento

Os experimentos foram realizados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) – Laboratório de Tecnologia Sucoenergética e Bioenergia (LTSBio), da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN).

4.2. Material

O milho utilizado para os experimentos foi obtido no mercado local de Piracicaba. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem *Thermosacc Dry Yeast* (Lallemand Ethanol Technology, Canada), foi adquirida no mercado nacional. Esta linhagem foi escolhida pelo fato de ser normalmente utilizada para produção de etanol a partir de milho.

4.3. Preparo do material

4.3.1. Moagem

Os grãos de milho foram moídos em moinhos tipo martelo até adquirir granulometria igual ou inferior à 2 milímetros. Esta fração foi denominada material particulado.

4.3.2. Liquefação do amido

Após a moagem, foi realizado o preparo de uma suspensão do material particulado com água, o qual teve seu pH ajustado para 5,5 com ácido sulfúrico 0,1 M e temperatura de 85°C. Em seguida foi adicionada a enzima alfa-amilase (EC 3.2.1.1.) na concentração de 0,1% (m.m⁻¹) e manteve-se a suspensão em constante agitação, sob a temperatura de 85 °C por 150 minutos para que ocorresse a liquefação do amido.

4.3.3. Sacarificação do amido

O amido dextrinizado obtido na Etapa 3.3.2 teve o pH ajustado para 5,0 com ácido sulfúrico 0,1 M e sua temperatura reduzida para 65°C. Adicionou-se a enzima

amiloglicosidase (EC 3.2.1.3.) na concentração de 0,1% (m.m⁻¹) e a mistura foi mantida sob constante agitação e temperatura de 65°C em banho maria com sistema de agitação (Marconi, modelo MA 093/1) por 150 minutos para que ocorresse a sacarificação.

4.3.4. Preparo do mosto

Após a etapa de sacarificação, o pH do hidrolisado foi alterado para 5,0, utilizando-se ácido sulfúrico 0,1 M, e o teor de açúcares redutores totais (ART) foi ajustado para 309 g.L⁻¹ mediante evaporação com aquecimento direto em chamas. O hidrolisado foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos e filtrado em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro, retendo as impurezas maiores que este diâmetro.

A eficiência do processo de hidrólise enzimática foi calculado a partir da divisão da massa de glicose extraída pela quantidade total de glicose disponível no milho, considerando que 72% do milho é composto por amido (PAES, 2006).

4.4. Ensaio de esterilização por feixes de elétron

4.4.1. Preparo do material a ser esterilizado

Antes de iniciar o tratamento com feixe de elétrons, a fim de simular a contaminação que ocorreria no ambiente industrial, foi preparado uma suspensão de inóculo contaminante para assegurar que o mosto antes de esterilizado esteja contaminado. Para isto, foi utilizado uma suspensão de bactérias do gênero *Lactobacillus*, compreendendo as espécies *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* e *L. reuteri*, na concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹, cedidas pelo banco de bactérias do Bioprocess Engineering Lab (BELa/POLI/USP).

4.4.2. Tratamento por feixe de elétrons

O mosto preparado e contaminado foi tratado no acelerador de elétrons do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, na dose de 20 kGy. Para isto adicionou-se o mosto em recipientes de vidro retangulares de borossilicato (Pyrex®) e cobertos com plástico filme de 0,1 mm. O volume adicionado em cada recipiente foi calculado para que a altura da amostra não ultrapassasse 4 mm.

A irradiação foi realizada em um acelerador de feixe de elétrons, Modelo JOB 188 (Dynamitron®), configurado com energia, largura e corrente do feixe de elétrons de $2,4 \cdot 10^{-13}$ J (1,5 MeV), 0,112 m e $5,61 \cdot 10^{-3}$ A, respectivamente. A velocidade da bandeja foi de $0,112 \text{ m.s}^{-1}$, proporcional a dose de 5 kGy por corrida, sendo realizada quatro passagens por amostra para atingir os 20 kGy.

Para o controle da dose de radiação ionizante que foi administrada, foi utilizado o sistema dosimétrico desenvolvido por Rela (2003), sendo este sistema baseado no princípio de que a absorção da radiação em um meio gera um incremento da temperatura do mesmo, possibilitando associar a temperatura com a dose absorvida.

Como forma de avaliação do tratamento radioativo, foi realizada a contagem total de microrganismos e de bactérias segundo a metodologia de Silva et al. (1997), por plaqueamento em gotas. Para isto, foi adicionada a unidade analítica pura e diluída 10^4 vezes em placas contendo meio MRS (Difco 0881-01-3), conforme descrito por Man et al. (1960), sendo adicionado 10 mg.L^{-1} de cicloheximida para contagem de bactérias totais. Após a adição de 100 μL do analito por placa, o crescimento microbiano foi realizado a 30°C por 48 horas em BOD (Marconi, modelo MA 415), seguido da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). mL^{-1} , segundo a equação 1.

$$UFC. \text{mL}^{-1} = \frac{\text{Número de colônias} \cdot 10}{\text{Diluição} \cdot \text{Volume inoculado}} \quad (1)$$

Após a irradiação, foi realizada a determinação de açúcares, conforme descrito na Etapa 4.6.4, para verificar os efeitos da radiação sobre os açúcares.

4.5. Ensaio da fermentação alcoólica

4.5.1. Tratamentos experimentais

O experimento foi desenvolvido com três Tratamentos. O primeiro Tratamento (T0) foi desenvolvido de forma a simular o que é executado em uma usina de processamento de etanol a partir de milho sem o reciclo de células, onde foi utilizado a concentração inicial de 1% (m.v^{-1}) base seca de células, constituindo, portanto, o tratamento controle. No segundo (T1) e terceiro (T2) Tratamento foi realizada a fermentação com concentração de 3% (m.v^{-1}) base seca de células, concentração equivalente a utilizada nas indústria de produção de etanol a partir de cana de açúcar com reciclo celular, sendo que entre os ciclos fermentativos do

Tratamento 2 nenhuma célula foi retirada, reciclando integralmente toda a biomassa, enquanto que no Tratamento 1, 59,5 gramas por litro de células foram retiradas do processo e destinadas para compor o WDG.

Tratamento 0 (T0): 1% de biomassa inicial sem reciclo (controle);

Tratamento 1 (T1): 3% de biomassa inicial e retirada de 59,5 gramas por litro de células a cada reciclo;

Tratamento 2 (T2): 3% de biomassa inicial e sem retirada de células a cada reciclo;

4.5.2. Ativação da levedura

Primeiramente, a levedura na concentração definida no Item 4.5.1 foi ativada na unidade operacional com uma solução diluída do mosto irradiado, na concentração de 103 g.L⁻¹ de ART, com volume de 30 mL e temperatura de 40°C, pelo período de 15 minutos.

4.5.3. Condições fermentativas

Após a ativação das células, 150 mL do mosto (309 g.L⁻¹) foi adicionada à cada unidade operacional, totalizando 180 mL com concentração final de 258 g.L⁻¹ de glicose. O processo fermentativo foi conduzido na forma de batelada simples em frascos do tipo Erlenmeyers com 500 mL de volume útil, agitação de 100 rpm e temperatura de 32°C.

4.5.4. Acompanhamento da fermentação

Para verificar o desenvolvimento da fermentação foram realizadas pesagens a cada hora como forma de avaliação do desprendimento de CO₂. Ao verificar a repetição dos valores de leitura do peso o ciclo de fermentação foi considerado finalizado.

Ao finalizar o ciclo fermentativo, o vinho foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, sendo o vinho delevedurado submetido às análises e a levedura separada foi direcionada tanto para análise quanto para o reciclo celular, segundo o Tratamento experimental definido no item 4.5.1.

O retorno das células de levedura entre os ciclos foi realizado pela transferência da quantidade de massa de levedura total ou excedente a 59,5 gramas por litro, após a centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, para uma nova unidade experimental. Após a

realização do reciclo, as etapas de ativação e fermentação foram realizadas como no primeiro ciclo fermentativo.

4.6. Parâmetros avaliados

4.6.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular das leveduras foi realizada a partir da metodologia de Pierce (1970), onde foi utilizado solução de azul de metileno 0,1% (v.v⁻¹) para coloração diferencial das células vivas e mortas.

Para a análise, coletou-se 0,1 mL do vinho e realizou-se a diluição em 4,9 mL de água destilada. Desta solução, 0,3 mL foram adicionados à 0,3 mL de solução de azul de metileno, seguido de agitação para que houvesse homogeneização. 10 µL desta solução foram transferidos para câmara de Neubauer e a leitura foi realizada no microscópio óptico com aumento de 400 vezes, sendo o cálculo da viabilidade obtido a partir da divisão do número de células vivas pelo número total de células (vivas mais mortas) e multiplicado por 100 para obtenção de um valor em porcentagem, assim como exposto na equação 2.

$$Viabilidade\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células} * 100 \quad (2)$$

4.6.2. Teor alcoólico

No término da fermentação foram realizadas coletas de amostras de vinho. Estas amostras foram centrifugadas e 25 mL do vinho de levedurado (sobrenadante) foi transferido para um microdestilador para álcool (Tecnal, modelo TE-012), no qual foi realizada a destilação por arraste de vapor. As amostras destiladas foram analisadas por densidade em um densímetro digital (Schimidt Haensch, modelo EDM 5000) com temperatura de 20 ±0,01 °C, obtendo-se o percentual de álcool puro contido no volume da amostra em grau Gay Lussac (°GL).

Além da análise por destilação, a produção de etanol e consumo de açúcar em gramas foram estimados a partir da equação de conversão estequiométrica da glicose em etanol e dióxido de carbono de Gay Lussac, onde o consumo de 1 grama de glicose resulta na produção de 0,5111 gramas de etanol e 0,4889 gramas de dióxido de carbono.

4.6.3. Rendimento e produtividade da fermentação

O rendimento da fermentação foi calculado a partir da concentração de açúcares redutores totais (ART) e da concentração de álcool no vinho delevedurado. Para isso utilizou-se a relação estequiométrica da fermentação alcoólica, na qual 100% de rendimento equivale a formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais (ART). O cálculo foi realizado a partir da equação 3.

$$\text{Rendimento fermentativo} = \frac{\text{Massa de etanol no vinho (g)}}{\text{ART (g)} * 0,5111} * 100 \quad (3)$$

A produtividade da fermentação alcoólica foi calculada a partir da concentração de álcool do vinho por volume total de vinho e tempo de fermentação, assim como expresso na equação 4, sendo expressa em gramas de álcool por litro hora ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Massa de etanol no vinho (g)}}{\text{Volume de vinho (L)} * \text{Tempo de fermentação (h)}} \quad (4)$$

4.6.4. Determinação de açúcares totais e glicerol

Os teores de glicose e glicerol foram determinados por cromatografia iônica, utilizando cromatógrafo de íons (Metrohm, modelo 930 Compact IC Flex) com detector amperométrico e coluna Metrosep Carb 1 150/4.0. Para análise foi utilizada como fase móvel a solução de NaOH 200 mmol.L^{-1} como eluente e velocidade de fluxo de 1 mL.minuto^{-1} a 35°C (VIDOTTI et al., 2009).

Para a realização das análises, as amostras de mosto e vinho foram diluídas 200 e 25 vezes, respectivamente, com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram filtradas com filtros de acetato de celulose de 0,45 μm . Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o volume de amostra injetado foi de 20 μL .

A concentração de glicose foi utilizada para o cálculo de açúcar residual, calculando-se a diferença entre a quantidade de glicose presente no início e no final de cada ciclo fermentativo. Já a concentração de glicerol, por se tratar de um carboidrato de reserva, foi utilizada como indicador do estresse que a levedura foi submetida.

4.6.5. Determinação de ácidos orgânicos no vinho

Como forma de acompanhamento da presença de contaminantes nos ciclos fermentativo, devido a possível recontaminação durante o manuseio dos materiais, foi realizada a quantificação indireta da presença de microrganismos contaminantes a partir da quantificação do conteúdo de ácido láctico e acético presente no vinho. Para a determinação desses analitos foi utilizado um cromatógrafo de íons (Metrohm, modelo 930 Compact IC Flex) com detector amperométrico e coluna Metrosep Organic Acids 250/7.8. Para análise foi utilizada solução de ácido sulfúrico 0,5 mM e 15% de acetona como eluente, cloreto de lítio 20 mM como solução de supressão e velocidade de fluxo de 1 mL.minuto⁻¹ a 35°C.

Para a realização das análises, as amostras de vinho foram diluídas 25 vezes, respectivamente, com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram filtradas com filtros de acetato de celulose de 0,45 µm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o volume de amostra injetado foi de 20 µL.

4.6.6. Determinação do conteúdo de trealose

O conteúdo de trealose foi determinado pelos métodos de Magalhães (2013) e Brin (1966). Para isso, inicialmente, 0,0536 gramas da levedura de cada unidade experimental foram pesadas. Em seguida foi realizada a adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) e a solução foi mantida durante 20 minutos em banho de gelo. Após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, 500 µL do sobrenadante foi coletado e diluído 10 vezes com água destilada. À esta solução foi adicionado o reagente Antrona na proporção de 1:10 e a reação ocorreu a 100°C em banho de ebulição por 10 minutos. Após a reação, a concentração de trealose foi determinada a partir da análise de absorbância da solução a 620 nm em espectrofotômetro e utilizando uma solução padrão contendo 15 µg de trealose. A concentração de trealose em gramas a cada 100 gramas de levedura foi calculada a partir da equação 5.

$$Trealose\left(\frac{g}{100\ g}\right) = \frac{15 * Absorbância\ solução * Volume\ precipitado\ (mL)}{Absorbância\ padrão * 0,3 * Massa\ seca\ levedura\ (g)} \quad (5)$$

4.6.7. Biomassa de levedura após o reciclo

O conteúdo de biomassa celular foi quantificada pela pesagem direta do creme de leveduras separado previamente do vinho por centrifugação. Para o cálculo da geração de biomassa celular, foi realizada a diferença de massa antes e depois do ciclo celular, seguido pela divisão deste valor pela massa inicial, obtendo assim o crescimento celular. Este valor foi multiplicado por 100 para obtenção do crescimento celular em porcentagem, como na equação 6.

$$\text{Crescimento celular}(\%) = \frac{\text{Biomassa final}(g) - \text{Biomassa inicial}(g)}{\text{Biomassa inicial}(g)} * 100 \quad (6)$$

4.6.8. Análise bromatológica do WDG

As amostras de sólidos do milho separados por centrifugação do hidrolisado líquido foram submetidos para a análise bromatológica após a adição da levedura utilizada no processo fermentativo.

Primeiramente, as amostras foram secas em forno de ar-forçado a 55°C por 72 horas. Após este período, as amostras secas foram moídas em moinho do tipo Wiley (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) para obtenção de um diâmetro de 1 milímetro. O conteúdo de matéria seca foi determinado por secagem em estufa a 105°C por 24 horas, segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990; #930.15), enquanto que o conteúdo de minerais foi determinado após incineração em mufla a 550°C por 4 horas (AOAC, 1990; #942.05). A concentração total de nitrogênio (proteína bruta) foi determinada utilizando o método de combustão de Dumas em um equipamento Leco TruMac N (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA) de acordo com AOAC (1997; #990.03). O conteúdo de extrato etéreo (EE) foi determinado utilizando um extrator do tipo Ankom XT15 (Ankom Tech Corp., Macedon, NY, EUA) de acordo com AOAC (1990; #920.39). O conteúdo de fibra detergente ácida e neutra (FDA e FDN) foi determinado utilizando um analisador de fibras do tipo Ankom A2000 (Ankom Tech Corp., Macedon, NY, EUA) de acordo com a metodologia de Van Soest et al. (1991), utilizando alfa-amilase termoestável e sulfato de sódio. A concentração de FDA e FDN foram corrigidas a partir do conteúdo de minerais. Por fim, o conteúdo de carboidratos não-fibroso foi determinado utilizando o kit Megazyme (Total Starch Assay Kit, K-TSTA-100^a, AOAC, 1995; #996.11).

4.7. Análise estatística

O experimento foi constituído por três tratamentos e quatro repetições e foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, com valor de $p < 0,05$ no ambiente R (versão 4.0.1, <http://www.r455project.org/>).

5. RESULTADOS

5.1. Crescimento e viabilidade celular

Inicialmente, a viabilidade celular da levedura desidrata foi aferida e a quantidade de células de leveduras utilizadas foram ajustadas para que fosse alcançada as concentrações exatas definidas nos tratamentos expostos no Item 4.5.1, garantido que fosse obtido 100% de células viáveis na concentração desejada.

Tanto o Tratamento 1 quanto o Tratamento 2 iniciaram o primeiro ciclo com $19,62 \pm 0,11$ gramas/180 mL (base úmida) de biomassa celular, atingindo ao final do processo fermentativo $18,47 \pm 0,29$ gramas/180 mL (base úmida) e $18,65 \pm 0,16$ gramas/180 mL (base úmida) para os Tratamentos 1 e 2, respectivamente, o que representa o decréscimo de 4,97% para o Tratamento 1 e 5,86% para o Tratamento 2, não havendo diferença estatística entre estes valores.

No segundo ciclo fermentativo, 10,71 gramas de células (equivalente a concentração de 59,5 gramas por litro) foram retiradas no Tratamento 1, iniciando o processo fermentativo com $7,76 \pm 0,24$ gramas/180 mL (base úmida) de biomassa. Ao final da fermentação, foram obtidas $10,24 \pm 0,24$ gramas/180 mL (base úmida) de biomassa, representando um crescimento de 32,16%, porém não alcançando quantidade de células suficientes para que o processo prosseguisse para outro ciclo celular, já que todas as células foram retiradas e destinadas para a formação do WDG, limitando o experimento para um total de dois ciclos.

Por fim, o Tratamento 2, que manteve integralmente a biomassa de $18,65 \pm 0,16$ gramas/180 mL (base úmida) no início do segundo ciclo, alcançou ao final do processo fermentativo $15,08 \pm 0,3$ gramas/180 mL (base úmida), representado um decréscimo de 9,12%.

Avaliando a viabilidade ao final dos ciclos foi possível determinar que as leveduras submetidas aos Tratamentos 1 e 2 finalizaram o primeiro ciclo com 50,02 e 48,44% de viabilidade, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os tratamentos, enquanto que ao final do segundo ciclo o Tratamento 1 obteve 29,96% de viabilidade e o Tratamento 2 alcançou 20,64% de células vivas, sendo este o menor valor de viabilidade obtida, como exposto na **Tabela 1**.

Tabela 1. Crescimento e viabilidade celular por ciclo fermentativo

Tratamento	Ciclo	Biomassa inicial (g/180 mL)	Biomassa final (g/180mL)	Crescimento (%)	Viabilidade inicial (%)	Viabilidade final (%)
T1	1°	19,62 ±0,11	18,47 ±0,29	- 4,97	82,70	50,02 a
	2°	7,76 ±0,29	10,24 ±0,24	32,16	50,02	29,96 b
T2	1°	19,62 ±0,11	18,65 ±0,16	- 5,86	82,70	48,44 a
	2°	18,64 ±0,17	15,08 ±0,30	- 9,12	48,44	20,64 c

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

O Tratamento controle (T0), no qual não foi realizado o reciclo celular, iniciou a fermentação com uma biomassa celular de 6,54 ±0,13 gramas/180 mL (base úmida) e atingiu ao final do processo fermentativo 10,71 ±0,23 gramas/180 mL (base úmida), representando um crescimento de 63,8%, como exposto na **Tabela 2**, a qual apresenta as porcentagens de crescimento da biomassa celular nos diferentes tratamentos. A determinação da biomassa final foi importante pois este valor foi utilizado para definir a quantidade de células que seria retirado a cada ciclo no Tratamento 1.

Na comparação da produção de biomassa entre os tratamentos, o Tratamento 2 foi aquele que apresentou a maior quantidade de células participando do processo fermentativo, porém o crescimento celular foi muito discreto, com valor de apenas 4,89%, enquanto que o Tratamento 1 decresceu na média 7,59% entre o início e final dos ciclos fermentativos.

Comparando os tratamentos ao agrupar os ciclos, apenas o Tratamento 0 apresentou diferença significativa em relação a viabilidade celular, finalizando o processo fermentativo com 80,13% de viabilidade, sendo o maior valor dentre os tratamentos, enquanto que o Tratamento 1 e 2 obtiveram uma viabilidade média de 38,56 e 29,90%, respectivamente.

Tabela 2. Crescimento e viabilidade celular por Tratamento

Tratamento	Biomassa inicial (g/180 mL)	Biomassa final (g/180mL)	Crescimento (%)	Viabilidade inicial (%)	Viabilidade final (%)
T0	6,54 ±0,13	10,71 ±0,27	63,80	82,7	80,13 a
T1	13,68 ±6,34	14,35 ±4,41	4,89	66,4	38,56 b
T2	19,13 ±0,54	17,78 ±0,93	- 7,59	65,6	29,90 b

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

5.2. Fermentação alcoólica

Os diferentes tratamentos e ciclos resultaram em diferentes durações no processo fermentativo, como exposto na **Tabela 3**.

No primeiro ciclo, o processo fermentativo do Tratamento 0 (controle) foi considerado encerrado após 42 horas, enquanto que tanto o Tratamento 1 quanto o Tratamento 2 conduziram o ciclo fermentativo por 31 horas, representando uma redução de 26% no tempo de fermentação. Já no segundo ciclo, o Tratamento 1 necessitou de 54 horas de fermentação, enquanto que o Tratamento 2 demandou 46 horas.

Os valores dos teores alcoólicos na relação $v.v^{-1}$ podem ser observados na **Tabela 3**. Os maiores teores alcoólicos foram obtidos no primeiro ciclo tanto pelo Tratamento 1 quanto pelo Tratamento 2, com valores de $14,24 \pm 0,20 (v.v^{-1})$ e $14,12 \pm 0,34 (v.v^{-1})$, respectivamente, sem existir diferença estatística entre os tratamentos neste ciclo, seguidos pelo Tratamento 2 no ciclo 2, com $13,93 \pm 0,21 (v.v^{-1})$ e pelo Tratamento 1 no ciclo 2, atingindo $13,82 \pm 0,30 (v.v^{-1})$.

Os maiores valores de teor alcoólico estão diretamente relacionados com o maior consumo de glicose disponível. Dessa forma, o Tratamento 1 no ciclo 1 apresentou o menor conteúdo de açúcar residual, com $20,31 \pm 0,02 g.L^{-1}$, seguido pelo Tratamento 2 no ciclo 1, com $20,21 \pm 0,02 g.L^{-1}$, pelo Tratamento 2 no ciclo 2, com $21,34 \pm 0,04 g.L^{-1}$ e pelo Tratamento 1 no ciclo 2, com $22,55 \pm 0,12 g.L^{-1}$, porém estes valores não apresentam diferença significativa.

Analisando individualmente cada ciclo, o Tratamento 1 no ciclo 1 obteve 90,88% de rendimento fermentativo e 88,58% no ciclo 2. Já o Tratamento 2 obteve 90,09% de rendimento no ciclo 1 e 88,84% no ciclo 2. Considerando o tempo despendido com a fermentação, ambos os tratamentos obtiveram maior produtividade no primeiro ciclo

fermentativo, com valores de 3,74 e 3,71 g.L⁻¹.h⁻¹ para os Tratamentos 1 e 2, respectivamente. Já no segundo ciclo a produtividade reduziu para ambos os tratamentos, sendo mais intensa no Tratamento 1, atingindo 2,08 g.L⁻¹.h⁻¹ contra 2,46 g.L⁻¹.h⁻¹ no Tratamento 2.

Os valores de produtividade seguem a mesma tendência do rendimento, onde ambos os tratamentos apresentaram maiores valores no primeiro ciclo, seguido pelo Tratamento 2 no ciclo 2 e, por último, o Tratamento 1 no ciclo 2.

Tabela 3. Parâmetros fermentativos por ciclo

Tratamento	Ciclo	Tempo (h)	Teor alcoólico (v.v ⁻¹)	Glicose residual (g.L ⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
T1	1°	31	14,24 ±0,20 a	20,31 ±0,02 a	90,88	3,74 ±0,05 a
	2°	54	13,82 ±0,30 c	22,55 ±0,12 a	88,58	2,21 ±0,05 c
T2	1°	31	14,12 ±0,34 ab	20,21 ±0,02 a	90,09	3,71 ±0,09 a
	2°	46	13,93 ±0,21 bc	21,34 ±0,04 a	88,84	2,46 ±0,04 b

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Ao se avaliar o tempo de fermentação médio considerando os dois ciclos, o Tratamento 1 necessitou de mais tempo para finalizar a fermentação do que o Tratamento 0, com 42,5 horas para o T1 contra 42 horas do T0. Já o Tratamento 2 apresentou o menor tempo de fermentação médio, despendendo 38,5 horas na média para atingir o final das fermentações, como exposto na **Tabela 4**.

Quando comparado os teores alcoólicos dos tratamentos podemos observar que o Tratamento 0 apresentou o menor teor alcoólico, com 13,73 ±0,01 (v.v⁻¹), não havendo diferença estatística entre os tratamentos que iniciaram o processo com 3% de células, independente da quantidade de células retirada entre os ciclos, atingindo 14,06 ±0,01 e 14,02 ±0,01 (v.v⁻¹) para o Tratamento 1 e 2, respectivamente.

O Tratamento 0 obteve um rendimento alcoólico de 87,51%, sendo o menor valor dentre os tratamentos. Enquanto isso, os Tratamentos 1 e 2 obtiveram os maiores rendimentos alcoólicos, com valores médios para os dois ciclos de 89,7 e 89,47%, respectivamente.

A partir da análise do tempo de fermentação e da quantidade de etanol produzidos em cada tratamentos, foi possível determinar que, assim como o rendimento, a produtividade dos Tratamentos 1 e 2 foram superiores ao Tratamento 0, com valores de $2,69 \pm 0,01$, $3,00 \pm 0,01$ e $2,66 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para os Tratamentos 1, 2 e 0, respectivamente.

Tabela 4. Parâmetros fermentativos por Tratamento

Tratamento	Tempo (h)	Teor alcoólico (v.v ⁻¹)	Glicose residual (g.L ⁻¹)	Rendimento (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
T0	42	13,73 \pm 0,01 b	20,87 \pm 0,02 a	87,51	2,66 \pm 0,01 b
T1	42,5	14,06 \pm 0,01 a	20,85 \pm 0,06 a	89,70	2,69 \pm 0,01 b
T2	38,5	14,02 \pm 0,01 a	20,77 \pm 0,04 a	89,47	3,00 \pm 0,01 a

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

5.3. Desprendimento de Dióxido de Carbono (CO₂)

O acompanhamento do desprendimento de dióxido de carbono durante a fermentação exposto na **Figura 1**, mostrou que o consumo de glicose e produção de etanol foram mais intensos no primeiro ciclo dos Tratamentos 1 e 2 (B e C), produzindo aproximadamente 39% do etanol total em apenas 6 horas, enquanto que nos Tratamentos 1 e 2 no segundo ciclo (D e E) produziram, respectivamente, 6,5% e 16% do etanol total no mesmo período. Já o Tratamento 0 (A) produziu 20,5% do etanol total no mesmo período de 6 horas.

Ao final de 30 horas, os Tratamentos 1 e 2 haviam consumido aproximadamente 96% da glicose disponível. No mesmo período do segundo ciclo, o consumo reduziu para 62% e 78% para os respectivos tratamentos, enquanto que o Tratamento 0 alcançou um consumo de 81% neste período.

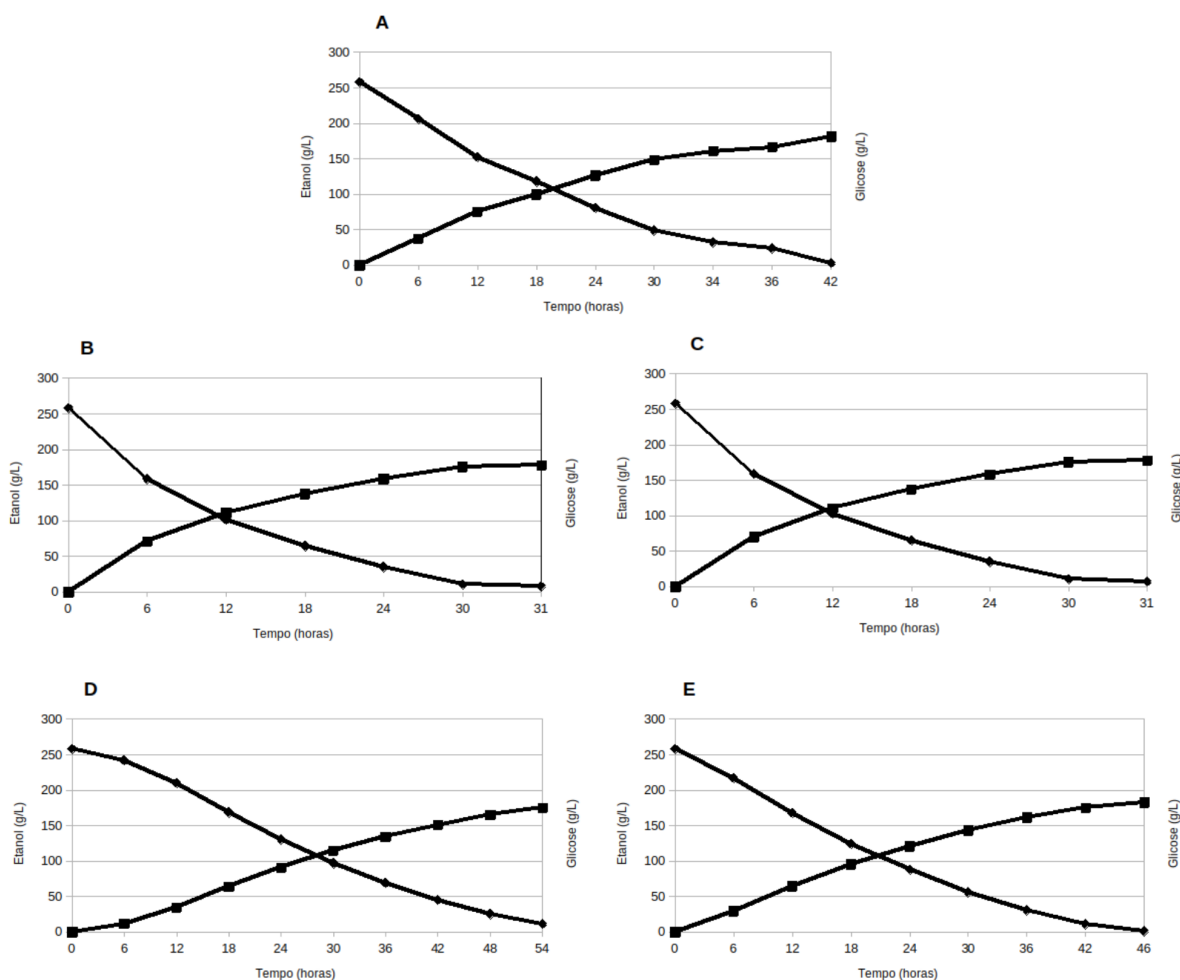


Figura 1. Valores de produção de etanol (□) e consumo de glicose (◇) estimados a partir do desprendimento de dióxido de carbono.

A: Tratamento 0 (T0); B: Tratamento 1 ciclo 1 (T1C1); C: Tratamento 2 ciclo 1 (T2C1); D: Tratamento 1 ciclo 2 (T1C2); E: Tratamento 2 ciclo 2 (T2C2).

5.4. Metabólitos associados à fermentação alcoólica

As leveduras submetidas ao reciclo integral de células, no Tratamento 2, apresentaram o menor conteúdo de trealose, com uma diminuição significativa no conteúdo de trealose do primeiro para o segundo ciclo neste tratamento, reduzindo de $8,84 \pm 0,05$ para $7,48 \pm 0,04$ gramas de trealose em 100 gramas de levedura (g/100g), enquanto que no Tratamento 1 não houve diferença significativa no conteúdo de trealose, alterando de $8,43 \pm 0,12$ para $8,05 \pm 0,02$ g/100g, no primeiro e segundo ciclo, respectivamente.

Além do conteúdo de trealose, o conteúdo de glicerol nas leveduras submetidas ao Tratamento 2, apresentaram o menor valor no segundo ciclo de fermentação, com $17,63 \pm 0,07$ g.L⁻¹, sendo menor que ambos os ciclos do Tratamento 1 que apresentaram

21,5 ±0,12 e 19,81 ±0,19 g.L⁻¹ de glicerol no primeiro e segundo ciclo, respectivamente, porém não diferindo significativamente do primeiro ciclo do Tratamento 2, com 22,14 ±0,06 g.L⁻¹.

Quanto ao conteúdo de ácidos orgânicos, somente foi possível determinar o conteúdo de ácido láctico nas fermentações com menor concentração de células, com valores de 0,015 ±0,005 g.L⁻¹ para o Tratamento 0 e 0,074 ±0,006 g.L⁻¹ no segundo ciclo do Tratamento 1, após a realização do reciclo com retirada de células. Em relação ao ácido succínico, os maiores valores foram obtidos no Tratamento 1 no primeiro ciclo, com 1,85 ±0,05 g.L⁻¹, seguido pelo mesmo tratamento no segundo ciclo e pelo Tratamento 2 no ciclo 1, com 1,45 ±0,03 e 1,50 ±0,02 g.L⁻¹. O reciclo de células integral realizado no Tratamento 2 ciclo 2 resultou no menor conteúdo de ácido succínico, com 1,16 ±0,04 g.L⁻¹.

Assim como no ácido succínico, o Tratamento 1 no primeiro ciclo apresentou o maior conteúdo de ácido acético, com 2,55 ±0,04 g.L⁻¹, seguido pelo Tratamento 2 no primeiro ciclo, com 2,40 ±0,03 g.L⁻¹, pelo Tratamento 2 no ciclo 2, com 1,71 ±0,03 g.L⁻¹ e pelo Tratamento 1 no ciclo 2, com 1,01 ±0,03 g.L⁻¹.

Tabela 5. Concentração de metabólitos por ciclo fermentativo

Tratamento	Ciclo	Trealose (g/100g)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ácido succínico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
T1	1°	8,43 ±0,12 ab	21,54 ±0,12 ab	1,85 ±0,05 a	2,55 ±0,04 a
	2°	8,05 ±0,02 ab	19,81 ±0,19 bc	1,45 ±0,03 b	1,01 ±0,03 d
T2	1°	8,84 ±0,05 a	22,14 ±0,06 a	1,50 ±0,02 b	2,40 ±0,03 b
	2°	7,48 ±0,04 b	17,63 ±0,07 c	1,16 ±0,04 c	1,71 ±0,03 c

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

A análise do conteúdo de trealose mostrou que o Tratamento 0 foi o único tratamento que apresentou diferença estatística no conteúdo intracelular de trealose, com 10,82 ±0,63 (g/100g), enquanto que os Tratamento 1 e 2 não diferiram no conteúdo, com valores de 8,24 ±0,90 e 7,48 ±0,37 g/100g, respectivamente.

O menor teor alcoólico encontrado no Tratamento 0 resultou em um menor conteúdo de glicerol, com $19,75 \pm 0,32 \text{ g.L}^{-1}$, seguido pelo Tratamento 2 com $19,88 \pm 1,17 \text{ g.L}^{-1}$ e pelo Tratamento 1 com $20,67 \pm 0,73 \text{ g.L}^{-1}$, não havendo diferença estatística entre estes valores.

O acompanhamento da presença de ácidos orgânicos no vinho mostraram que os maiores valores de ácido succínico foram obtidos no Tratamento 0, seguido do Tratamento 1 e pelo Tratamento 2, com $2,36 \pm 0,17$, $1,58 \pm 0,21$ e $1,33 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

Em relação ao ácido acético, o maior conteúdo foi encontrado no Tratamento 2, com $2,06 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$, seguido pelo Tratamento 1 e pelo Tratamento 0, com $1,67 \pm 0,62$ e $1,65 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 6. Concentração de metabólitos por Tratamento

Tratamento	Trealose (g/100g)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ácido succínico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)
T0	10,82 ± 0,63 a	19,75 ± 0,32 a	2,36 ± 0,17 a	1,65 ± 0,05 b
T1	8,24 ± 0,90 b	20,67 ± 0,73 a	1,58 ± 0,21 b	1,67 ± 0,62 ab
T2	7,48 ± 0,37 b	19,88 ± 1,17 a	1,33 ± 0,17 c	2,06 ± 0,28 a

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

5.5. Grãos úmidos de destilaria com solúveis (WDGS)

A composição de sólidos do WDGS sofre influência direta do processo enzimático de hidrólise do milho, onde foi utilizado 24,15 Kg de milho contendo 17,39 kg de amido, formando um volume de 27,69 litros de hidrolisado não concentrado com 143 g.L^{-1} de concentração média de glicose, gerando ao total 3,96 Kg de glicose, o que representa uma eficiência de hidrólise de 22,77%.

Como forma de controle para verificar a interferência da concentração de células presentes no WDGS utilizou-se um controle (C) contendo apenas os sólidos presentes no milho, os quais foram previamente separados do hidrolisado líquido utilizado na fermentação.

Os valores obtidos da análise centesimal do WDGS estão expostos na **Tabela 7**. Podemos observar que o conteúdo de matéria seca (MS), fibras em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos (CNF) não se alteraram dentre os tratamentos. O conteúdo de proteína bruta (PB) apresentou menor valor no Tratamento 0 e

no controle, com valores não estatisticamente diferentes entre os Tratamentos 1 e 2. Quanto ao extrato etéreo (EE), o controle apresentou valor superior aos Tratamentos 1 e 2, porém não diferiu do Tratamento 0. Por fim, o conteúdo de minerais (MM) nos Tratamentos 1 e 2 foram superiores ao encontrado no Tratamento 0.

Tabela 7. Composição centesimal do WDGS

Tratament o	MS (%)	PB (%)	FDA (%)	FDN (%)	EE (%)	MM (%)	CNF (%)
C	36,35 a	14,30 b	4,95 a	17,40 a	1,65 a	2,75 ab	63,90 a
T0	36,00 a	14,37 b	4,77 a	19,32 a	1,50 ab	2,00 b	62,85 a
T1	36,07 a	15,05 a	5,26 a	18,72 a	1,41 b	3,22 a	61,58 a
T2	36,20 a	15,20 a	4,72 a	18,45 a	1,37 b	3,52 a	61,47 a

MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; FDA = Fibra em detergente ácido; FDN = Fibra em detergente neutro; EE = Extrato etéreo; MM = Matéria mineral; CNF = Carboidratos não fibrosos.

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a viabilidade de uma dada proposta tecnológica da aplicação do reciclo celular no processamento de etanol a partir de milho com alto teor alcoólico (VHG), utilizando alta densidade celular de inóculo e mosto esterilizado por radiação ionizante; também teve por objetivo verificar a qualidade bromatológica do WDGS gerado no processo proposto, visando aumentar a produtividade do processo fermentativo e manter a qualidade nutricional do WDGS.

A comparação do crescimento e da viabilidade celular entre os ciclos e entre os tratamentos mostraram que quanto maior a concentração de células no início do processo, menor foi o aumento no número de células e maior foi a queda na viabilidade das mesmas, consequência de uma maior competição dos microrganismos pelos substrato disponível, assim como maior estresse pela produção rápida de etanol, pois o etanol retarda o crescimento da levedura e reduz a viabilidade celular (FERREIRA, 2002). Além disso, a viabilidade celular reduziu com o passar dos ciclos devido a recorrente exposição das células as condições estressantes, como alto teor alcoólico, assim como relatado por Cerqueira (2013). Devido à redução acentuada da viabilidade celular associada à estas condições estressantes impostas, como alto teor alcoólico e alta pressão osmótica, há indícios de que, nas condições que foram conduzidos os ensaios do presente trabalho, utilizando uma concentração de inóculo de 3%, o número de ciclos fermentativos possíveis não deve ser superior a dois ciclos, permitindo que fosse realizado o reciclo de células uma única vez.

Dentre os fatores estressantes, o etanol presente principalmente no final do processo fermentativo é um dos principais agentes nocivos para a levedura, atuando principalmente na permeabilidade da membrana plasmática, interferindo em diversos processos fisiológicos, inibindo o crescimento celular e a atividade enzimática (BASSO et al., 2011). Adicionalmente, o estresse alcoólico pode ser intensificado pela presença de altas temperaturas e acidez, causando maior impacto na viabilidade das células (DORTA et al., 2006). Segundo Pereira et al. (2011), estudando a levedura PE-2 em fermentações com alto teor de sólidos (VHG), concentrações de teor alcoólico maiores do que a 17,7% (v.v⁻¹) são críticas, reduzindo drasticamente a viabilidade e as reservas de trealose, porém as concentrações encontradas em processos fermentativos convencionais, que variam entre 8 e 12% (v.v⁻¹), já são suficientes para causar estresse para a levedura, configurando o teor alcoólico como o principal fator estressante do processo fermentativo (BASSO et al., 2011).

No presente trabalho, se tratando de uma fermentação VHG, os valores gerados de teor alcoólico foram superiores aos valores encontrados em processo convencionais, o que pode explicar o porquê de ser observado uma queda tão contundente na viabilidade celular.

Neste estudo, os teores alcoólicos foram decrescentes com passar dos ciclos devido a redução da viabilidade. Pereira (2012) obteve resultados similares aqueles utilizando a levedura PE-2 em fermentação com aplicação do reciclo ao final do ciclo fermentativo e 340 g.L⁻¹ de glicose, resultando em ciclos fermentativos com duração média aproximada de 36 horas, onde a viabilidade no terceiro reciclo decaiu de 80% (viabilidade inicial no primeiro ciclo) para 20% (viabilidade final no terceiro ciclo), reduzindo a produtividade em 66%, enquanto que Cerqueira (2013) obteve resultados opostos, com valores crescentes na produção de etanol ao longo dos ciclos com mosto de cana-de-açúcar na concentração de 250 g.L⁻¹ utilizando tanto a levedura PE-2 quanto a CAT-1, atingindo valores máximo ao final de 6 ciclos de 14,43 ±0,17 e 15,15 ±0,12 (v.v⁻¹), respectivamente, porém com ciclos terminando com períodos definidos de 24 horas. A diferença encontrada pode estar relacionada com a linhagem de levedura utilizada e ao tempo de fermentação, pois a levedura *Thermosacc Dry* não foi desenvolvida com o objetivo da aplicação tecnológica do reciclo, já que esta prática não é usualmente aplicada nas usinas de processamento de etanol a partir de milho, assim como processos fermentativos com maior duração têm por consequência maior exposição da levedura às condições estressantes, reduzindo a viabilidade.

A concentração de células também impactou diretamente o tempo de fermentação, sendo obtido no presente estudo tempos fermentativos maiores quanto menor as concentrações de inóculo participantes do processo, demandando mais tempo para que o substrato disponível fosse convertido em etanol e outros metabólitos. No presente trabalho, os tempos de fermentação foram inferiores aos relatados na literatura, onde segundo Reis et al. (2017), a geração de etanol tendo o milho como substrato é um processo com duração média de 48 a 72 horas, com a fermentação utilizando 3% de inóculo sendo 26% mais rápida do que a fermentação com 1% neste estudo.

Além do inóculo inicial, a realização do reciclo permite maior acúmulo de células, obtendo uma maior densidade celular e, dessa forma, melhorando a produtividade alcoólica (VAN HOEK et al., 2000), porém, neste estudo, o estresse alcoólico decorrente do alto teor

alcoólico no meio causou uma redução na viabilidade e a diminuição no número de células, reduzindo a produtividade no segundo ciclo. Pereira (2012) realizando reciclo celular observou que o acúmulo de células gerado pela realização do reciclo reduziu o tempo despendido com a fermentação em 25% após 3 reciclos, de 39,1 para 29,4 horas com uma concentração de células crescendo 6,36 vezes, porém, após estes 3 reciclos o tempo de fermentação voltou a aumentar devido à queda na viabilidade das células, despendendo o mesmo tempo do primeiro ciclo no quinto, mesmo com uma população 8,1 vezes superior.

Quanto aos tratamentos estudados, os maiores valores calculados de rendimentos fermentativos foram condizentes com a literatura, onde maiores concentrações de inóculos resultaram em melhores rendimentos fermentativos, assim como determinado por Amorim e Basso (2003), com tanto o Tratamento 1 quanto o 2 apresentando valores superiores ao rendimento médio de 89% obtido nas indústrias de processamento de etanol a partir de milho (WHEALS et al., 1999). As concentrações de glicose residual foram insignificantes ao final de cada ciclo, sugerindo que os processos foram conduzidos até que as fermentações estivessem completas.

De forma geral, foi possível observar neste estudo que a fermentação com VHG em batelada simples e a aplicação do reciclo impactaram na viabilidade das leveduras e causaram mudanças fisiológicas como forma de defesa às condições estressantes impostas.

A intensidade do estresse fermentativo também pode ser observada pela menor concentração de trealose nos Tratamentos com maior concentração de células, pois este carboidrato de reserva é metabolizado em situações de estresse para a resistência e minimização dos danos gerados pelas condições nocivas (BASSO et al., 2008), resultando em valores inferiores ao final do processo. Pereira (2012) observou em seu estudo que no primeiro ciclo fermentativo as células de levedura da linhagem PE-2 acumularam os maiores conteúdos intracelulares de trealose, alcançando valores de 16,1 g/100g, com este valor reduzindo drasticamente durante os reciclos realizados, alcançando 9,3 g/100g ao final do 15º ciclo, juntamente com uma queda na viabilidade de 63 para 27%. Neste estudo, a levedura *Thermosacc* armazenou um valor inferior de trealose no primeiro ciclo ao valores encontrados por Pereira (2012) e apresentou uma queda nesta reserva mais intensa durante o reciclo celular. Esta variação pode estar relacionada à diversas variáveis envolvidas, como a composição de ácidos graxos da membrana citoplasmática das diferentes linhagens utilizadas nos estudos (DELGADO, 1993).

Além da trealose, o glicerol é outro composto celular relacionado à sobrevivência e proliferação das células de leveduras em situação de estresse, atuando na manutenção do balanço redox e o acúmulo intracelular deste subproduto metabólico desempenha um papel fundamental para a redução do estresse hiperosmótico (MICHNICK et al., 1997), porém a concentração deste composto é encontrada com valores superiores quanto maior o efeito estressante, ocorrendo o oposto da trealose. No presente estudo, o reciclo integral de células resultou em aumento no conteúdo de glicerol, enquanto que a retirada de células e o menor conteúdo de teor alcoólico no segundo ciclo do Tratamento 2 resultaram em valores menores de glicerol. Furlan (2012) observou em seu trabalho com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e concentração de etanol de 8 a 15% que o teor de glicerol aumentou de 0,5 a 1% ao longo de 7 ciclos fermentativos quanto maior a concentração de etanol no meio.

As concentrações de ácido láctico e acético seguem a mesma tendência da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica, tornando a quantificação do teor destes produtos metabólicos um indicador bastante preciso do grau de contaminação do processo fermentativo, já que é proporcional ao número de células bacterianas contaminantes (AMORIM et al., 1996). Com o aumento na concentração de ácido láctico e acético no meio fermentativo, superando 0,1% (m.v⁻¹), há redução na taxa de consumo de glicose e na produção de etanol, assim como redução na biomassa celular total (NARENDRANATH, 2001). Maiorella et al (1983) observaram a redução de 80% na geração de biomassa celular em fermentações com *Saccharomyces cerevisiae* quando 7,5 g.L⁻¹ de ácido acético ou 38 g.L⁻¹ de ácido láctico estavam presentes no meio. Além disso, menores valores de pH no meio estão relacionados com a redução do conteúdo mineral das leveduras e das reservas intracelulares de trealose (FERREIRA et al., 1999). Dziekonska et al. (2015) em seu estudo observou que concentrações de ácido acético inferiores a 2 g.L⁻¹ não causam inibições significativas no processo fermentativo, apenas aumentando ligeiramente o início da fase adaptativa da levedura, porém, em concentrações superiores a estes valores, há um acréscimo significativo no tempo despendido na fase de adaptação, resultando em uma menor produtividade. Oliva-Neto e Yokoya (1994) mostraram também que a presença de contaminação bacteriana tem consequências na viabilidade celular, reduzindo a viabilidade após 15 ciclos em mais de 64%.

Segundo Remize et al. (1999), a influência da concentração de açúcar na produção de ácidos orgânicos aparenta ser significativa, onde o estresse osmótico imposto pela alta

concentração de açúcar pode levar a uma maior formação de glicerol e, como resposta visando a obtenção de um balanço redox, há maior produção de ácido acético (ERASMUS et al., 2004). No presente trabalho esta correlação direta não foi evidenciada, porém foi possível observar que os menores valores de ácido succínico e maiores valores de ácido acético foram obtidos quanto maior a concentração de células participando, já que estes ácidos estão diretamente relacionados ao metabolismo da levedura.

Outra relação retratada na literatura diz respeito ao conteúdo de ácido acético e trealose. O ácido acético é o principal ácido orgânico volátil gerado durante a fermentação e sua produção pode estar relacionada tanto ao metabolismo da levedura quanto à presença de microrganismos contaminantes, principalmente as bactérias lácticas (WHITING, 1976). Independente da fonte geradora do ácido acético, seja oriundo da levedura ou das bactérias contaminantes, a presença deste ácido é indesejado pois causa distúrbios celulares que ocasionam estresses para a levedura, reduzindo o conteúdo de trealose (THOMSSON; LARSSON, 2006). Esta relação foi identificada no presente trabalho, onde quanto maior o conteúdo de ácido acético menor o conteúdo de trealose, contribuindo para explicar os baixos valores de crescimento celular e viabilidade obtidos.

Além do conteúdo de ácidos orgânicos e os diferentes aspectos fermentativos retratados no presente trabalho, a análise centesimal do WDG foi performada, já que este coproduto apresenta grande importância para o processo de obtenção de etanol a partir de milho. A utilização do WDGS ou dos grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) na alimentação animal trouxe para este coproduto alto valor agregado e grande impacto no faturamento da indústria (KUMAR; SINGH, 2019). Vander Pol et al. (2006) avaliando a inclusão de diferentes quantidades de DDGS na dieta de terminação de novilhos observaram que a adição de 30% do coproduto na dieta dos animais gerou os melhores resultados de ganho de carcaça e ganho médio diário. Além disso, os autores enfatizaram que independente da quantidade de DDGS adicionado houve um incremento na eficiência alimentar quando comparado com uma dieta controle a base apenas de milho.

No presente trabalho, o WDGS formado apresentou concentrações nutricionais inferiores às retratadas na literatura, onde o conteúdo de proteína encontrado por Shone (2015) e Sperotto (2017) foram de 26,42% e 25,65%, respectivamente. Assim como o conteúdo de proteína, Ciftci et al. (2012) encontrou em seu estudo valores superiores na concentração de extrato etéreo e material mineral, com valores de 8,61% e 4,81%,

respectivamente. Tjardes e Wright (2002) estipularam em seu estudo os limites encontrados de diferentes WDGS produzidos, encontrando que o conteúdo de proteína variou entre 30 e 35%, extrato etéreo entre 8 e 12%, fibra em detergente neutro entre 30 e 50% e conteúdo de sólidos entre 25 e 35%, sendo este o único componente do WDGS inferior ao encontrado no presente estudo.

As diferenças observadas podem estar relacionadas a eficiência de hidrólise obtida neste trabalho, pois Ballin (2017), utilizando diferentes variedades de mandioca obteve eficiências de hidrólise muito superiores às obtidas no presente trabalho, com valores entre 87,4% e 92,9%. Diversos fatores podem afetar a eficiência das enzimas amilolíticas, como as condições de armazenamento, o tempo e temperatura da hidrólise e a geração de sacarídeos, o que pode atuar como um sinal de inibição do tipo feedback para a atividade enzimática, reduzindo a eficiência de hidrólise (MITHRA et al., 2018). Além disso, a composição química do WDGS apresenta grande variabilidade dependendo de alguns fatores, como a matéria-prima utilizada, a linhagem de levedura adicionada, as condições de fermentação, a eficiência de destilação, o processo de secagem e a concentração de solúveis no produto final (TJARDES; WRIGHT, 2002).

A partir da análise centesimal do WDGS produzido neste estudo, foi possível observar que o principal componente que sofreu variação devido as condições impostas pelos tratamentos foi o teor de proteína, sendo benéfico para a composição do DDG a utilização de um maior inóculo inicial. Este resultado está de acordo com Yamada e Sgarbieri (2005), pois a levedura apresenta uma composição média de 39,6% de proteína da massa seca da célula inteira, logo dependendo da quantidade de levedura adicionada ao WDGS há um impacto na composição do teor proteico. Além disso, a concentração de proteína bruta e extrato etéreo foram superiores nos tratamentos com maior concentração de inóculo, pois segundo Costa (2018) quanto maior a adição de solúveis no DDGS, menor a concentração de proteína bruta e fibra em detergente neutro, e maior a concentração de lipídeos.

Independente da quantidade de células retiradas no reciclo celular, não houve diferença estatística na qualidade nutricional do WDGS formado, indicando que apenas a utilização de uma maior concentração de inóculo impactou de forma contundente na composição do WDGS nas condições utilizadas neste estudo.

7. CONCLUSÃO

A concentração inicial de 3% de inóculo realizada nos tratamentos com reciclo celular resultaram em maiores teores alcoólicos, assim como maior produtividade e rendimento, contribuindo efetivamente para uma melhora na qualidade do processo fermentativo. Além disso, a utilização do reciclo integral das células resultou em uma maior produtividade para o processo.

Em relação à composição do WDGS, a aplicação do reciclo e maior concentração de células inicial também impactou positivamente na qualidade nutricional do coproduto, independente da quantidade de células retirada entre os reciclos, gerando um produto com maior concentração de proteína.

Conclui-se que a utilização de uma maior concentração inicial de células e a reutilização da levedura por mais um ciclo trouxeram benefícios tecnológicos para o processo de produção de etanol a partir de milho, aumentando a produtividade fermentativa e a qualidade nutricional do WDGS, tornando viável a incorporação desta proposta tecnológica.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R.; MARCOS, J.; WALDER, M. Comparison Between Gamma Radiation and Kamoran HJ in the Decontamination of Kamoran H Sugarcane Must. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 25, p. 137–147, 2001.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 677–681, 2003.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Volume de pé-de-cuba caso a caso. In: ENCONTROS FERMENTEC – REUNIÃO ANUAL, 27., 2003, Piracicaba, SP. **Resumos**: Fermentação alcoólica. Piracicaba: Fermentec, 2003. p. 22.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, M. D. G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: Fermentec, 1996.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., 1981, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Piracicaba: STAB, 1981. v. 1, p. 158-168.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 14. ed. Washington, DC, 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, DC, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16. ed. Washington, DC, 1997.

ASAKURA, T.; TODA, K. New cell recycle ethanol fermentation with periodic cleaning of filter with gas. **Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 83–88, 1991.

BAI, F. W.; CHEN, L. J.; ZHANG, Z.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 287–293, 2004.

BALLIN, F. **Avaliação do desempenho produtivo de variedades de mandioca na região central do estado do Tocantins e o rendimento de etanol por meio de hidrólise enzimática**. 2017. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) – Universidade Federal de Tocantins, Palmas, Tocantins, 2017.

BARBER, A. R.; HENNINGSSON, M.; PAMMENT, N. B. Acceleration of high gravity yeast fermentations by acetaldehyde addition. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 891–895, 2002.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H. V. **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996. cap. 4, p. 38-85.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

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**. London: Intech Open, 2011. cap. 5, p. 95-100.

BASSO, L. C.; CARTE, C. L.; SILVESTRINI, C.; PAULILLO, S. C. L.; LUCATTI, L.; COSTA, V. M. **Estudo comparativo entre a levedura “turbo” e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos**. Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica. Piracicaba: ESALQ/USP, 2003. v. 23, p. 12-25.

BELLOCH, C.; ORLIC, S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 188–195, 2008

BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model, **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 1-8, 2000.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 19-25, 2005.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2009.

BRIN, M. Transketolase: clinical aspects. **Methods in Enzymology**, v. 9, p. 506-514, 1966.

CALEGARI, R. P. **Ethanol production from the fermentation of sterilized wort by electron beam followed by methane production from its vinasse**. 2021. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2021.

CECCATO-ANTONINI, S. R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, art. 80, 2018.

CERQUEIRA, D. P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. 2013. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CERVI, W. R.; LAMPARELLI, R.; SEABRA, J.; JUNGINGER, M.; van der HILST, F. Bioelectricity potential from ecologically available sugarcane straw in Brazil: A spatially explicit assessment. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 391–399, 2019.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CIFTCI, O. N.; CALDERON, J.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of corn distiller’s dried grains with solubles: Experiments and mathematical modeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 51, p. 12482–12490, 2012.

CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.; SILVA, D. D.; MACHADO, J. R. A.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M. **Milho: caracterização e desafios tecnológicos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 45 p. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, v. 2).

CORADI, P. C.; CHAVES, J. B. P.; LACERDA FILHO, A. F.; MOTA, A. T. O. Quality of stored grain of corn in different conditions. **Científica**, v. 42, n. 2, p. 118–133, 2014.

COSTA, I. C.; RESENDE, L. R.; OLIVEIRA, J. V.; BARATA, F. G.; SILVA, A. L. M.; GOUVÊA, M. A.; RODRIGUES, J. P.; GABRIEL, A. F.; SILVA, A. A. Coprodutos da indústria de etanol de milho na alimentação de ruminantes. **PUBVET**, v. 12, n. 11, p. 1-7, 2018.

COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 77-85, 2018.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Produção de etanol deve chegar a 35,5 bilhões de litros e consumirá 65% da safra**. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimasnoticias/3202-producao-de-etanol-deve-chegar-a-35-5-bilhoes-de-litros-e-consumira-65-dacana-moida>>. Acesso em: 14 nov. 2021.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G. G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 191-195, 1991.

DELGADO, D. A. **Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces termotolerantes***. 1993. 105 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

DICKSON, J. Radiation inactivation of microorganisms. In: MOLINS, R. **Food irradiation: principles and applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 2, p. 31-68.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHINA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 177-182, 2006.

DZIEKONSKA, U. K.; PATELSKI, P.; BALCEREK, M.; PIELECH, K. P.; STRAL, E. **Effect of acetic acid concentration on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae***. Łódź, Polônia: University of Technology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, 2015.

EHSAN, S.; MAHMOUDZADEH, A.; ABDUL, M. A review on green energy potentials in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 533–545, 2013.

ELSZTEIN, C.; DE MENEZES, J. A. S.; DE MORAIS, M. A. Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 967–973, 2008.

ERASMUS, D. L.; CLIFF, M.; VUUREN, H. J. J. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of Icewine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 55, p. 371-378, 2004.

FERREIRA, L. V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. 2002. 266 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 10, p. 29-32, 1999.

FURLAN, R. M. C. **Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N. V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 469–474, 2006.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141–146, 2006.

HANSEN, A. C.; KYRITSIS, D. C.; LEE, C. F. Characteristics of biofuels and renewable fuel standards. In: SINGH, V. **Improvements in corn to ethanol production technology using *Saccharomyces cerevisiae***. Urbana: Wiley, 2010. cap. 1, p. 28-51.

HENRY, F. C. Irradiation effects on meat: a review. **Revista de Ciências Agrárias - Lisboa**, v. 32, p. 255-262, 2009.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmo adaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 300-372, 2002.

IGLESIAS, C.; SESMERO, J. P. **Economic analysis of supplementing sugarcane with corn for ethanol production in Brazil**: A case study in Uberaba. Heidelberg: Springer, 2015. p. 627-643.

INGLEDEW, W. M. M.; LIN, Y. H. Ethanol from Starch-Based Feedstocks. In: **Comprehensive biotechnology**. 2. ed. Saskatoon: Elsevier B.V., 2011. v. 1, p. 37–50.

JIN, M.; JIANG, X.; CHEN, X.; YUAN, X.; LIU, Z.; LI, Y. Boosting ethanol productivity of *Zymomonas mobilis* 8b in enzymatic hydrolysate of dilute acid and ammonia pretreated corn stover through medium optimization, high cell density fermentation and cell recycling. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, art. 2316, 2019.

JONES, A. M.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: Appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 483-488, 1994.

KILCAST, D. Irradiation and combination treatments. **Food Control**, v. 2, n. 1, p. 6–8, 1991.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. Part II: Potential source of energy and chemical products. In: ROEHR, M. **The biotechnology of ethanol**: classical and future applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. p. 139-166.

LIMA FILHO, T.; TEIXEIRA, L. J. Q.; ROCHA, C. T.; FERREIRA, G. A. M.; SOUZA, M. C. Energia ionizante na conservação de alimentos: Revisão. **Boletim CEPPA**, v. 30, n. 2, p. 243–254, 2012.

LIU, L.; CHENG, S. Y.; HUANG, Y. F. Mitigating Environmental Pollution and Impacts from Fossil Fuels: The Role of Alternative Fuels. **Energy Sources**, v. 29, n. 12, p. 1069–1080, 2007.

LOPES, M. L.; CRISTINA, S.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazil Journal of Microbiology**, p. 1–13, 2016.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 829-845, 2010.

MADSON, P. W. Ethanol distillation: the fundamentals. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. **The alcohol textbook**. 4. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. cap. 22, p. 319-336.

MADSON, P. W. Ethanol distillation: the fundamentals. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. **The alcohol textbook**. 5. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 289-303.

MAGALHÃES, R. S. S. **Acúmulo de trealose em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em proteínas do complexo enzimático trealose sintase**. 2013. 65 p. Dissertação (Projeto Final de Curso) – Centro de Ciências da Matemática e da Natureza, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 103-121, 1983.

MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.

MICHNICK, S.; ROUSTAN, J. L.; REMIZE, F.; BARRE, P.; DEGUIN, S. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. **Yeast**, v. 13, p. 783–793, 1997.

MITHRA, M. G.; JEEVA, M. L.; SAJEEV, M. S.; PADMAJA, G. Comparison of ethanol yield from pretreated lignocellulose-starch biomass under fed-batch SHF or SSF modes. **Heliyon**, v. 4, n. 10, e.00885, 2018.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2001.

NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; WOLNIEWICZ, E.; BILLA, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 490–493, 1990.

NOLASCO JUNIOR, J. **Desenvolvimento de processo térmico otimizado para mosto de caldo de cana na fermentação alcoólica**. 2005. 199 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

NOLASCO JUNIOR, J. **Eficiência de processo térmico para mostos a base de caldo de cana e melão na produção de bioetanol**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed- batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 697-699, 1994.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Circular Técnica, 75).

PANEK, A. C.; MANSURE, J. J. A.; PASCHOALIN, M. F.; PANEK, D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperature shifts. **Biochimie**, v. 72, p. 77-79, 1990.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011.

PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 45-53, 2012.

PEREIRA, L. G.; CAVALETT, O.; BONOMI, A.; ZHANG, Y.; WARNER, E.; CHUM, H. L. Comparison of biofuel life-cycle GHG emissions assessment tools: The case studies of ethanol produced from sugarcane, corn and wheat. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 110, p. 1-12, 2019.

PIERCE, J. S. Institute of brewing: analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, n. 5, p. 442-443, 1970.

PODADERA, P. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. 2007. 99 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PULIGUNDLA, P.; SMORGROVICOVA, D.; OBULAN, V. S. R.; KO, S. Very high gravity ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T. P.; SILVA, J. B.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 971-983, 2017.

RAVNÖ, A. B.; PURCHASE, B. S. Dealing with dextran in the South African sugar industry. In: Annual Congress of South African Sugar Technologists' Association, 2005, Kwa- Shukela, Mount Edgecombe, South Africa. **Proceedings...** Mount Edgecombe, KwaZulu-Natal, South Africa: South African Sugar Technologists' Association, 2005. p. 28-47.

REIS, C. E. R.; RAJENDRAN, A.; HU, B. New technologies in value addition to the thin stillage from corn-to-ethanol process. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, p. 175-206, 2017.

RELA, P. R. **Desenvolvimento de dispositivo de irradiação para tratamento de efluentes industriais com feixe de elétrons**. 2003. 149 p. (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

REMIZE, F.; ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P.; DEQUIN, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in byproduct formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 143-149, 1999.

RENEWABLE FUEL STANDARD - RFA, 2017. **Building Partnerships / Growing Markets** – 2017. Ethanol Industry Outlook. Washington, DC, 2017. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2017/02/Ethanol-IndustryOutlook-2017.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Handbook of enology**. v. 1: The microbiology of wine and vinifications. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.

RIGANAKOS, K. A. Food Irradiation Techniques. In: ARVANITOYANNIS, I. **Irradiation of Food Commodities: techniques, applications, detection, legislation, safety and consumer opinion**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 23-42.

SAMUTA, T.; ARAMAKI, I.; HASHIZUME, K. Production of sake from rice material exposed to γ -radiation and technical development for its production Characterization of low-dose exposed rice and small-scale brewing with it. **Kokuritsu Kikan Genshiryoku Shiken Kenkyu Seika Hokoku-Sho**, n. 36, p. 24/1-24/6, 1997.

SARKS, C.; JIN, M.; SATO, T. K.; BALAN, V.; DALE, B. E. Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, art. 73, 2014.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; SANIAY, V.; RAHUL, B. Production of Biofuel (Ethanol) from Corn and co product evolution: A Review. **International Research Journal of Engineering and Technology**, v. 3, n. 12, p. 745–749, 2016.

SHONE, R. A. **Resíduo seco de destilaria com solúveis (DDGS) na alimentação de frangos de corte**. 2015. 57 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2015.

SILVA, E. A. **Esterilização de mosto para a produção de etanol**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.

SILVA, V. F. N.; NAKANISHI, S. C.; DIONÍSIO, S.; ROSSELL, C.; IENCZAK, J.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. Using cell recycling batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 1853-1859, 2016.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SPEROTTO, F. C. S. **Abordagem multiprocessual e caracterização dos grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) de milho**. 2017. 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Considerações sobre tratamentos de caldo de cana para fermentação alcoólica. **Álcool e Açúcar e Sub-Produtos**, v. 3, p. 40–46, 1981.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, 1984.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 321–331, 1996.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; JONES, A. M.; INGLEDEW, W. M. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: effect of sugar concentration and fermentation temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, p. 211–226, 1993.

THOMSSOM, E.; LARSSON, C. The effect of lactic acid on anaerobic carbon or nitrogen limited chemostad cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 533-542, 2006.

TJARDES, K.; WRIGHT, C. Feeding Corn Distiller's Co-Products to Beef Cattle. **Animal & Range Sciences**, v. 2036, p. 1–5, 2002.

US ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. **Fuel Ethanol Plant Production Capacity**. Monthly Report of Biofuels, Fuels from Non-Biogenic Wastes, Fuel Oxygenates, Isooctane, and Isooctene. 2021 - Disponível em: <<https://www.eia.gov/petroleum/ethanolcapacity/>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

VAN HOEK, P.; HULSTER, E.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 518–523, 2000.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VANDER POL, K. J.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; ROBB, T. Effect of dietary inclusion of wet distiller's grains on feedlot performance of finishing cattle and energy value relative to corn. **Nebraska Beef Cattle Reports**, n. 120, p. 51-53, 2006.

VERACINI, J. L.; WALKER, P. M.; FAULKNER, M. J.; HALL, R. E.; ATKINSON, R. L.; WIEGAND, B. R. Effects of high fat, modified wet, corn distiller's grains plus soluble on beef steer performance and carcass characteristics. **Livestock Science**, v. 157, n. 1, p. 151–161, 2013.

VIDOTTI, M.; CERRI, C. D.; CARVALHAL, R. F.; DIAS, J. C.; MENDES, R. K.; TORRESI, S. I. C. DE; KUBOTA, L. T. Nickel hydroxide electrodes as amperometric detectors for carbohydrates in flow injection analysis and liquid chromatography. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 636, n. 1-2, p. 18–23, 2009.

WANG, S.; THOMAS, K. C.; SOSULSKI, K.; INGLEDEW, W. M.; SOSULSKI, F. W. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 421–428, 1999.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482-487, 1999.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, p. 84-92, 1976.

WOLFROM, M. L.; BINKLEY, W. W.; MCCABE, L. J. The Effect of Ionizing Radiation on Carbohydrates. The Irradiation of Sucrose and Methyl α -D-Glucoopyranoside. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, p. 5, 1959.

YAMADA, E. A.; SGARBIERI, V. C. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3931-3936, 2005.

YAMAKAWA, C. K.; LEAL, J. S. M.; JUNIOR, J. N.; ROSSELL, C. E. V. **Processos de fermentação alcoólica com reciclo de células**. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 2016.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 1, p. 12-16, 1991.

ZANIN, G.; SANTANA, C.; BON, E.; GIORDANO, R.; DE MORAES, F.; ANDRIETTA, S.; NETO, C.; MACEDO, I.; LAHR, F. D.; RAMOS, L.; FONTANA, J. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, p. 1147–1161, 2000.

ZHAO, Y.; LIN, Y. H. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a chemostat under high glucose conditions. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1151–1154, 2003.