



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CAMILA OLIVEIRA DOS SANTOS

**DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONTAMINANTES  
SELVAGENS DURANTE ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DO ETANOL**

**Dissertação de Mestrado**

GOIÂNIA – GO  
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese

### 2. Nome completo do autor

Camila Oliveira dos Santos

### 3. Título do trabalho

DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONTAMINANTES SELVAGENS DURANTE ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DO ETANOL

### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 19/04/2021, às 20:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CAMILA OLIVEIRA DOS SANTOS, Discente**, em 22/04/2021, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1890275** e o código CRC **BC211539**.

CAMILA OLIVEIRA DOS SANTOS

**DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONTAMINANTES  
SELVAGENS DURANTE ETAPAS DO PROCESSO PRODUTIVO DO ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni

GOIÂNIA – GO  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Camila Oliveira dos  
DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE  
CONTAMINANTES SELVAGENS DURANTE ETAPAS DO  
PROCESSO PRODUTIVO DO ETANOL [manuscrito] / Camila  
Oliveira dos Santos. - 2021.  
XVI, 69 f.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto  
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química ,  
Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de  
tabelas.

1. Etanol. 2. Leveduras selvagens. 3. Fermentação industrial. 4.  
Cultura mista. I. Castiglioni, Dr. Gabriel Luis, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 42 da sessão da Defesa de Mestrado de **Camila Oliveira dos Santos**, que confere o título de **Mestra em Engenharia Química**, na área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Aos vinte de janeiro de dois mil e vinte e um, a partir da(s) 08h30m, por **Videoconferência**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado da discente **Camila Oliveira dos Santos** intitulada "**DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (EA-UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Franciolo Vendruscolo (EA - UFG)** e **Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez (ICB - UFG)**. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido a candidata **aprovada**, condicionada à correção dos cálculos e demais sugestões da banca avaliadora, pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte de janeiro de dois mil e vinte e um.

#### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Diagnóstico e avaliação da influência de contaminantes selvagens durante etapas do processo produtivo do etanol



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni**, Professor do Magistério Superior, em 21/01/2021, às 08:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Franciolo Vendruscolo**, Professor do Magistério Superior, em 21/01/2021, às 08:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Armando Garcia Rodriguez**, Professor do Magistério Superior, em 21/01/2021, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1814334 e o código CRC 9453D6CD.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são abertura para achar as que estão certas”

**Carl Sagan**

## RESUMO

A produção de etanol representa uma parcela importante na economia nacional. Com a utilização da cana-de-açúcar como matéria-prima, o Brasil se posiciona como o segundo maior produtor do mundo. Embora o processo de produção do etanol esteja bem estabelecido, muitos fatores contribuem para sua eficiência, como a qualidade da matéria-prima, condições do processo e contaminantes microbianos. O mosto de caldo de cana-de-açúcar é um substrato bastante complexo e permite o desenvolvimento de outras leveduras do gênero *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, portanto a população microbiana durante as fermentações industriais pode ser bastante dinâmica, podendo o fermento ser totalmente substituído no processo por leveduras selvagens. Em vista disso, este estudo se propõe a estudar as características fermentativas de cepas de leveduras contaminantes isoladas de seis etapas do processo produtivo de uma usina produtora de etanol do estado de Goiás e as implicações que essas leveduras poderiam ter no rendimento final de etanol. As amostras foram coletadas do mel final, mosto, caldo bruto, caldo decantado, fermento do pé de cuba e vinho fermentado. Das colônias isoladas do vinho fermentado, encontrou-se uma linhagem de levedura selvagem com aspecto rugoso e bordas irregulares em nível de contaminação de 77,4 % da amostra. Dessa forma, foram realizados ensaios fermentativos em triplicatas com mosto sintético de cana-de-açúcar com aproximadamente 160 g.L<sup>-1</sup> de açúcares com período de 72 horas de fermentação. Primeiramente foram avaliados o desempenho da levedura isolada do vinho fermentado (LFS) em comparação com as linhagens industriais *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2. A LFS obteve valores inferiores em concentração final de etanol, produtividade e eficiência fermentativa em comparação com as linhagens industriais. Porém, em ensaios fermentativos de cultura mista da LFS em níveis de contaminação de 2, 10, 20 e 30 % com as linhagens BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, a LFS apresentou níveis de contaminação final mais baixo que o inicial, mostrando assim a competência das leveduras industriais sobre a levedura selvagem. Nessas mesmas condições com reutilização do inóculo, a LFS foi reduzida de 30 % para 0,2 % no final de 10 fermentações consecutivas. No entanto, a levedura isolada LFS passou a ter maior dominância nas fermentações de cultura mista com a linhagem PE-2 e em mosto com adições de óxido de cálcio, entre concentrações de 0,05 g.L<sup>-1</sup> e 0,30 g.L<sup>-1</sup>, os resultados mostraram queda significativa na eficiência fermentativa. O mosto da usina apresentou concentração adicional de cálcio de 0,09 g.L<sup>-1</sup> após o tratamento de calagem, essa concentração é preocupante tendo em vista que nos ensaios com a concentração de 0,10 g.L<sup>-1</sup> de adição de óxido de cálcio foram os resultados mais favoráveis a LFS. Possivelmente, essa foi uma das condições que favoreceu a situação crítica de contaminação observada nas amostras da usina, sugere-se a possibilidade de substituição do óxido de cálcio no tratamento de calagem ou alternativas que minimizem a presença de íons Ca<sup>2+</sup> no mosto para que não privilegie o desenvolvimento de leveduras floculantes e não comprometa a eficiência e produtividade industrial.

**Palavras-chave:** etanol; leveduras selvagens; fermentação industrial; cultura mista.

## ABSTRACT

Ethanol production represents an important share in the national economy. With the use of sugarcane as a raw material, Brazil is positioned as the second largest producer in the world. Although the ethanol production process is well established, many factors contribute to its efficiency, such as the quality of the raw material, process conditions and microbial contaminants. Sugarcane juice must is a very complex substrate and allows the development of other yeasts of the genus *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*, so the microbial population during industrial fermentations can be quite dynamic, and the yeast can be completely replaced in wild yeast process. In view of this, this study proposes to study the fermentative characteristics of contaminating yeast strains isolated from six stages of the production process of an ethanol producing plant in the state of Goiás and the implications that these yeasts could have on the final ethanol yield. The samples were collected from the final melasse, must, concentrated broth, decanted broth, yeast from the vat and fermented wine. From the colonies isolated from the fermented wine, a wild yeast strain with rough appearance and irregular edges was found at a contamination level of 77.4 % of the sample. Thus, fermentative tests were carried out in triplicates with synthetic must of sugar cane with 120 g.L<sup>-1</sup> of sugars with a period of 72 hours of fermentation. Firstly, the performance of fermented wine isolated yeast (LFS) was evaluated in comparison with the industrial strains *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L and PE-2. LFS obtained lower values in final ethanol concentration, productivity and fermentative efficiency compared to industrial strains. However, in LFS mixed culture fermentative tests at contamination levels of 2, 10, 20 and 30 % with strains BG-1, CAT-1, FT-858L and PE-2, the LFS showed higher levels of final contamination than the initial, thus showing the competence of industrial yeasts over wild yeast, in these same conditions with reuse of the inoculum, the LFS was reduced from 30 % to 0.2 % at the end of 10 consecutive fermentations. In this study, the isolated LFS yeast became more dominant in mixed culture fermentations with the PE-2 strain and in must with calcium oxide additions, between concentrations of 0.05 g.L<sup>-1</sup> and 0.30 g.L<sup>-1</sup>, the results showed a significant drop in fermentation efficiency. The wort of the plant presented an additional calcium concentration of 0.09 g.L<sup>-1</sup> after the liming treatment, this concentration is worrying considering that in the tests with the concentration 0.10 g.L<sup>-1</sup> of calcium oxide, it was observed that the speed growth rate of LFS was greater than that of the PE-2 strain, possibly this was the condition that favored the critical contamination situation observed in the plant samples, and may mention the possibility of replacing calcium oxide in liming treatment or alternatives that minimize the presence of Ca<sup>2+</sup> ions in the must so that it does not favor the development of flocculating yeasts.

**Keyword:** ethanol; wild yeasts; industrial fermentation; mixed culture.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema simplificado do processo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar.....6
- Figura 2** - Síntese do etanol na célula de levedura. Abreviações: HK – Hexoquinase, PGI – Fosfoglicomutase, PFK – Fosfofrutoquinase, FBPA - Frutose difosfato aldolase, TPI – Fosfotrioseisomerase, GAPDH – Gliceraldeído fosfato desidrogenase, PGK - Fosfogliceroquinase, PGM – Fosfogliceromutase, ENO – Enolase, PYK – Quinase pirúvica, PDC – Descarboxilase pirúvica e ADH – Desidrogenase alcoólica. .... 10
- Figura 3** - Fluxograma do processo produtivo da usina de etanol e os locais de coleta das seis amostras.....20
- Figura 4** - Fluxograma com as descrições das etapas executadas na pesquisa.....21
- Figura 5** - Contaminação encontrada no processo de produção de etanol de uma usina do Estado de Goiás. Sendo, (A) é a amostra do caldo bruto, (B) mosto, (C) fermento do pé-de-cuba e (D) vinho fermentado.....30
- Figura 6** - Dendrograma de Cluster dos agrupamentos referentes aos micro-organismos isolados do caldo bruto (A), mosto (B), fermento de pé de cuba (C) e vinho fermentado (D).33
- Figura 7** - Resultados de produção de etanol (A), concentração celular (B), consumo de açúcares (C), produção de glicerol (D) e ácido acético (E) das leveduras BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e LFS após 72 horas de fermentação.....38
- Figura 8** - Resultados de produção de etanol (A), concentração celular (B), consumo de açúcares (C), formação de glicerol (D) e ácido acético (E) das fermentações realizadas com *S. cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS. ....42
- Figura 9** - Resultados de predominância nas fermentações com diferentes níveis de contaminação inicial (2, 10, 20 e 30% de LFS). Sendo a LFS em cultura mista com (A) BG-1, (B) CAT-1, (C) FT-858L e (D) PE-2. ....46

<b>Figura 10</b> - Análise de competência das cepas em cultura mista com porcentagem inicial de células de 30 % LFS, 17,5 % BG-1, 17,5 % CAT-1, 17,5 % FT-858L e 17,5 % PE-2 com reutilização do inóculo ao longo de 10 fermentações.....	48
<b>Figura 11</b> - Resultados de concentração celular e formação de metabólitos das levedura PE-2 em cultura mista com a LFS em fermentações com diferentes concentrações de óxido de cálcio após 72 horas de fermentação. Sendo (A) a concentrações de etanol, (B) concentrações celulares, (C) consumo de açúcares, (D) concentração de glicerol e (E) concentração de ácido acético.....	50
<b>Figura 12</b> - Resultados de predominância da PE-2 com níveis de contaminação inicial de 30 % de LFS acrescido de óxido de cálcio no mosto (0,0; 0,05; 0,10; 0,20 e 0,30 g.L <sup>-1</sup> ).....	55
<b>Figura 13</b> - Resultados de predominância da PE-2 com níveis de contaminação inicial de 30% de LFS em mosto acrescido de óxido de cálcio nas concentrações 0,10 g.L <sup>-1</sup> e com reutilização do inóculos por 3 fermentações. ....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Meio de cultura GPY para manutenção das leveduras.....	22
<b>Tabela 2</b> - Meio de cultura GPY líquido para manutenção das leveduras.....	22
<b>Tabela 3</b> - Número de colônias de micro-organismos contaminantes selecionadas para as fermentações para os pontos coletados na usina. ....	24
<b>Tabela 4</b> - Proporções do inóculo para as fermentações com as cepas BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 com LFS. Concentração celular inicial das fermentações foram mantidas em 0,1 g.L <sup>-1</sup> . ....	24
<b>Tabela 5</b> - Proporções dos inóculos nas fermentações com <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e LFS em mosto sintético de cana-de-açúcar, acrescido de diferentes concentrações de óxido de cálcio. Concentração celular inicial igual a 0,1 g.L <sup>-1</sup> .....	25
<b>Tabela 6</b> - Curva de calibração das cepas BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e LFS. Onde (y) é concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ) e (x) absorvância. ....	26
<b>Tabela 7</b> - Unidades formadoras de colônia encontradas nas diferentes etapas do processo produtivo na usina de etanol.....	31
<b>Tabela 8</b> - Resultados das médias de concentração celular, consumo de açúcares e formação de metabolitos dos grupos de micro-organismos isolados do caldo bruto, mosto, mel final, fermento do pé-de-cuba e vinho fermentado.....	35
<b>Tabela 9</b> - Resultados fermentativos de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e concentração de glicerol das cepas BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e LFS após 72 horas de fermentação. ....	39
<b>Tabela 10</b> - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de	

conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa BG-1 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS. ....44

**Tabela 11** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa CAT-1 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS. ....44

**Tabela 12** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa FT-858L em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS. ....45

**Tabela 13** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa PE-2 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS. ....45

**Tabela 14** - Parâmetros fermentativos de concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e concentração de glicerol das cepas *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em cultura mista com a LFS em fermentações com diferentes concentrações de óxido de cálcio. ....52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AAS	<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
ART	Açúcar Redutores Totais
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Açúcar Total Recuperáveis
BG-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BG-1
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sacarose
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Etanol
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glicose
CAT-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1
CaO	Óxido de Cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CONAB	Comissão Nacional de Abastecimento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FT-858L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FT-858L
GPY	<i>Glucose, Peptone, Yeast extract</i>
H <sup>+</sup>	Íon de Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Pb(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub>	Chumbo Tetraetila
PE-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-1
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PRÓALCOOL	Programa Nacional do Alcool
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP/mtDNA	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism of Mitochondrial DNA</i>
RNA	Ácido ribonucleico

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
H	Horas
rpm	Rotação por minuto
% v/v	Porcentagem de volume em 100 mililitro de solução
% m/v	Porcentagem de massa em 100 mililitro de solução
$\text{g.L}^{-1}$	Gramas por litros
$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Gramas por litro por hora
$\text{g}_{\text{etanol}}.\text{g}^{-1}$	Gramas de etanol por gramas de vinho fermentado
$\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{g}^{-1}$	Gramas de biomassa por gramas de vinho fermentado
$g$	Força G
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto ( $\text{g}_{\text{etanol}}.\text{g}^{-1}$ );
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em produto ( $\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{g}^{-1}$ )
$P_f$	Concentração final de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P_0$	Concentração inicial de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S_f$	Concentração final de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S_0$	Concentração inicial de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$\emptyset$	Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$t_f$	Tempo total de fermentação
$\eta$	Eficiência fermentativas (%)
$\text{UFC.mL}^{-1}$	Unidade formadora de colônia por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Etanol .....	3
2.1.1. Características e Aplicações .....	3
2.1.2. Contexto Econômico .....	3
2.1.3. Processo Produtivo Industrial .....	5
2.1.4. Etapas do Processo .....	6
2.2. Fermentação Alcoólica .....	8
2.2.1. Microrganismos da Fermentação .....	8
2.2.2. Processo Bioquímico .....	9
2.2.3. Rendimento Fermentativo Industrial .....	11
2.3. Biodiversidade das Leveduras .....	15
2.3.1. Principais Técnicas de Identificação de Leveduras .....	16
2.3.2. Interações entre Micro-organismos .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
3.1. Objetivo Geral .....	19
3.2. Objetivos Específicos .....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	20
4.1. Isolamento, Microrganismos e sua Manutenção .....	21
4.2. Preparo do Mosto Sintético .....	22
4.3. Fermentações .....	23
4.3.1. Ensaio Fermentativos .....	23
4.4. Determinação da Concentração Celular .....	25
4.5. Determinação de Cálcio no Mosto da Usina .....	26
4.6. Determinação dos Metabólitos e Açúcares Residuais .....	26

4.7.	Cálculo dos Parâmetros Fermentativos.....	27
4.8.	Análise da Competência das Linhagens Industriais .....	28
4.9.	Análise Estatística.....	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
5.1.	Isolamentos dos Micro-organismos Contaminantes .....	30
5.2.	Desempenho Fermentativo dos Isolados .....	33
5.3.	Desempenho Fermentativo das Linhagens Industriais e LFS.....	37
5.4.	Desempenho Fermentativo das Linhagens Industriais em Cultura Mista com Diferentes Porcentagens de LFS .....	41
5.5.	Competência das Linhagens Industriais em Cultura Mista com LFS.....	46
5.6.	Desempenho fermentativo da Linhagem PE-2 em Cultura Mista com a LFS em Mosto Acrescido de Óxido de Cálcio.....	49
5.7.	Competência da Linhagem PE-2 em Cultura Mista com a LFS.....	54
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>68</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade imediata de reduzir os gases de efeito estufa e de modificar a dependência de fontes de energia não renováveis traz a produção brasileira de etanol com uma excelente alternativa para essas questões. O etanol é um biocombustível que pode ser utilizado diretamente em veículos *fuel-flex* ou adicionado à gasolina para melhorar sua octanagem. Sua produção é a partir de fontes renováveis e a produção no Brasil a partir da cana-de-açúcar se destaca para um importante passo na mudança na matriz energética mundial, pois o etanol de cana-de-açúcar contém cerca de 370 % mais energia do que gasta para a sua obtenção, sendo mais energeticamente viável do que o etanol proveniente de outras matérias-primas como o milho (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009; CASTRO, 2018).

A produção de etanol é realizada pela fermentação dos açúcares contidos no caldo de cana-de-açúcar e/ou melão. O processo envolve a adição de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que fermentam a mistura por 4 a 12 horas, gerando o vinho com uma concentração de etanol de 7 % a 10 %. As operações nas usinas geralmente envolvem o processo de recuperação das leveduras, as células são separadas do vinho fermentado por centrifugação e tratadas com ácido sulfúrico. Essa prática intensifica as condições de estresse que as cepas de leveduras encontram durante o processo, como alto teor alcoólico, alta pressão osmótica, baixo pH, alta temperatura e outros (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; LIMA; MARCONDES, 2012).

Muitos fatores contribuem para a eficiência desse processo, como qualidade da matéria-prima, condições do processo e contaminantes microbianos. A contaminação por outros micro-organismos pode ocasionar a diminuição do rendimento fermentativo devido a formação de goma, flocculação do fermento ou inibição e queda da viabilidade das leveduras devido à produção de toxinas. O mosto de caldo de cana-de-açúcar é um substrato bastante complexo e permite o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido lático e outras leveduras do gênero *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Dependendo da procedência da cana, do período da colheita e de outros diferentes fatores, estima-se que o mosto deve conter entre  $10^3$  e  $10^4$  de células contaminantes por mililitro (SOUZA-LIBERAL *et al.*, 2005; NOBRE *et al.*, 2007; SOUZA-LIBERAL *et al.*, 2007).

Com o sistema atual de produção de etanol o assentamento de células de leveduras no fundo das dornas e perdas de células nas centrífugas podem ser bastante comuns. Isso ocorre

devido a contaminação da fermentação alcoólica industrial por bactérias, especialmente do gênero *Lactobacillus*, como também algumas linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* que apresentam propriedade de crescer de forma floculada. (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001; ANDRIETTA *et al.*, 2007).

De acordo com Andrietta *et al.* (2007) nos anos 90, quando métodos para identificação de leveduras foram introduzidos, constatou-se que as leveduras utilizadas como inóculo na fermentação eram completamente substituídas por leveduras selvagens, portanto as cepas nativas apresentavam maiores capacidade de dominância e persistência no processo com relação as cepas iniciadoras da fermentação.

Tendo em conta as observações mencionadas e considerando a importância do etanol no mercado, as avaliações das condições de contaminação microbiana no processo e os estudos sobre as evidências que favorecem a dominância de linhagens selvagem são justificados para evitar prejuízos das usinas de etanol, considerando os grandes volumes de produção industrial que temos atualmente no país.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Etanol

#### 2.1.1. Características e Aplicações

O etanol ou álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) pertence ao grupo de compostos orgânicos e possui um grupo hidroxílico ligado a um radical alquila. O álcool etílico caracteriza-se por ser um líquido incolor, volátil, inflamável e solúvel em água, além disso possui um odor característico e propriedades que o classifica como solvente, germicida e anti-congelante (PEREIRA; ANDRADE, 1998; LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011). O etanol pode ser produzido pela fermentação de açúcares ou síntese química pela hidratação do etileno ou redução do acetaldeído, porém a fermentação é a forma mais econômica, sendo utilizada desde os tempos antigos na fabricação de bebidas alcoólicas pela fermentação de vegetais, tais como cereais, beterraba, batata e cana (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; ROEHR, 2001; LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011).

Atualmente o álcool etílico é encontrado na indústria alimentícia na produção de vinagre e em bebidas como cerveja, vinho e aguardente, já na indústria farmacêutica é utilizado na produção de medicamentos, vacinas e antibióticos. O álcool etílico está presente também na composição de produtos de limpeza e cosméticos. Contudo, sua principal finalidade é como combustível de motores de combustão interna, o etanol é um biocombustível e possui a vantagem de ser de fontes renováveis, como cana-de-açúcar, milho e batata, com isso, possui fortes motivações para sua produção, contribuindo para diversificar as fontes energéticas e reduzir a emissão dos gases do efeito estufa (MACHADO; ABREU, 2006; ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009; LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011).

#### 2.1.2. Contexto Econômico

O etanol também exerce um papel importante na economia nacional, a produção na safra de 2018/2019 atingiu 33,14 bilhões de litros, utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar, posicionado o Brasil como o segundo maior produto do mundo (CONAB, 2019), enquanto o maior produtor, os Estados Unidos, utilizando o milho como matéria-prima,

produziu 60,56 bilhões de litros no mesmo ano. Contudo, a produção de bicomcombustível a partir da cana apresenta vantagens no balanço energético e tem uma maior rentabilidade, visto que para cada hectare cultivado de cana-de-açúcar produz em média 6800 litros de álcool, enquanto que a mesma área cultivada de milho fornece apenas 3200 litros, além disso, o álcool produzido da cana tem 370 % mais energia do que gasta para a sua obtenção. Além de tudo, a produção de etanol vem crescendo no país em razão da grande extensão territorial, do clima propício para a cultura da cana-de-açúcar e o domínio da tecnologia da fabricação do etanol (XAVIER, 2007; ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009; AQUINO *et al.*, 2014).

Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, o total da safra de 2018/2019 foi de 620,41 milhões de toneladas, dos quais 35,29 % foram destinadas a produção de açúcar e 64,7 % para a produção de etanol (CONAB, 2019; CHIEPPE JUNIOR, 2012). Além disso, algumas usinas têm utilizado a biomassa da cana-de-açúcar para geração de energia elétrica (bioeletricidade), buscado assim maior eficiência, reduzindo os custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade (ALMEIDA, 2018). Fomentando a importância da cultura da cana-de-açúcar no agronegócio do país, o PIB do setor na safra 2017/2018 foi estimado em cerca de R\$ 85 bilhões, gerando cerca de 800 mil empregos diretos por meio das 365 usinas no país, os estados com maiores produções na safra 2018/2019 foram o estado de São Paulo com 332,88 milhões de toneladas, em seguida Goiás com 70,00 milhões de toneladas e Minas Gerais com 63,20 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CASTRO, 2018; CONAB, 2019).

A produção industrial do etanol apresenta uma composição que varia em função da sua utilização, o álcool hidratado possui teor de umidade residual de 4 % a 6 % e é utilizado como combustível de veículos *flex fuel*, (LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011; CONAB, 2018), já o álcool anidro, com umidade residual inferior a 1 %, é adicionado à gasolina em torno de 25 %, essa adição faz com que reduza o preço da gasolina, aumente sua octanagem e reduza a emissão de poluentes da gasolina. A produção de etanol hidratado corresponde a 57,88 % do total produzido, enquanto etanol anidro, influenciada pelo aumento do consumo de gasolina nos últimos anos, é de 42,12 %. (CONAB, 2018).

A adição de álcool anidro na gasolina começou a partir da criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, assim foi possível a substituição completa do chumbo tetraetila ( $Pb(C_2H_5)_4$ ), que era usado para aumentar a octanagem da gasolina, mas que é uma substância tóxica e libera partículas de chumbo no ar. O programa Proálcool foi criado devido à crise do petróleo no início dos anos 70, e serviu para estimular a produção do etanol

e atender a demanda de combustível no país, o objetivo era desenvolver técnicas e aperfeiçoamento dos insumos para a produção de álcool etílico, assim, após a primeira etapa que foi o acréscimo do etanol anidro na gasolina, os primeiros carros movidos totalmente a etanol hidratado começaram a circular em 1978 após modificações técnicas nos motores (TÁVORA, 2011; LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011; ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009).

### 2.1.3. Processo Produtivo Industrial

O processo produtivo de etanol no Brasil é obtido pela fermentação a partir dos açúcares contidos no caldo do colmo da cana-de-açúcar (LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011). As indústrias sucroalcooleiras até início dos anos 60 utilizavam a fermentação em batelada, onde o mosto era inoculado em uma dorna até o estágio final de fermentação, ou seja, até que a atividade da levedura cessasse por falta de nutrientes ou por excesso de etanol. Atualmente os processos que se empregam nas indústrias são com reutilização de leveduras, que são o batelada-alimentada (Melle-Boinoit) e o processo contínuo, sendo cerca de 85% dos processos industriais utiliza o batelada-alimentada e 15 % o processo contínuo (STECKELBERG, 2001; GODOY *et al.*, 2008).

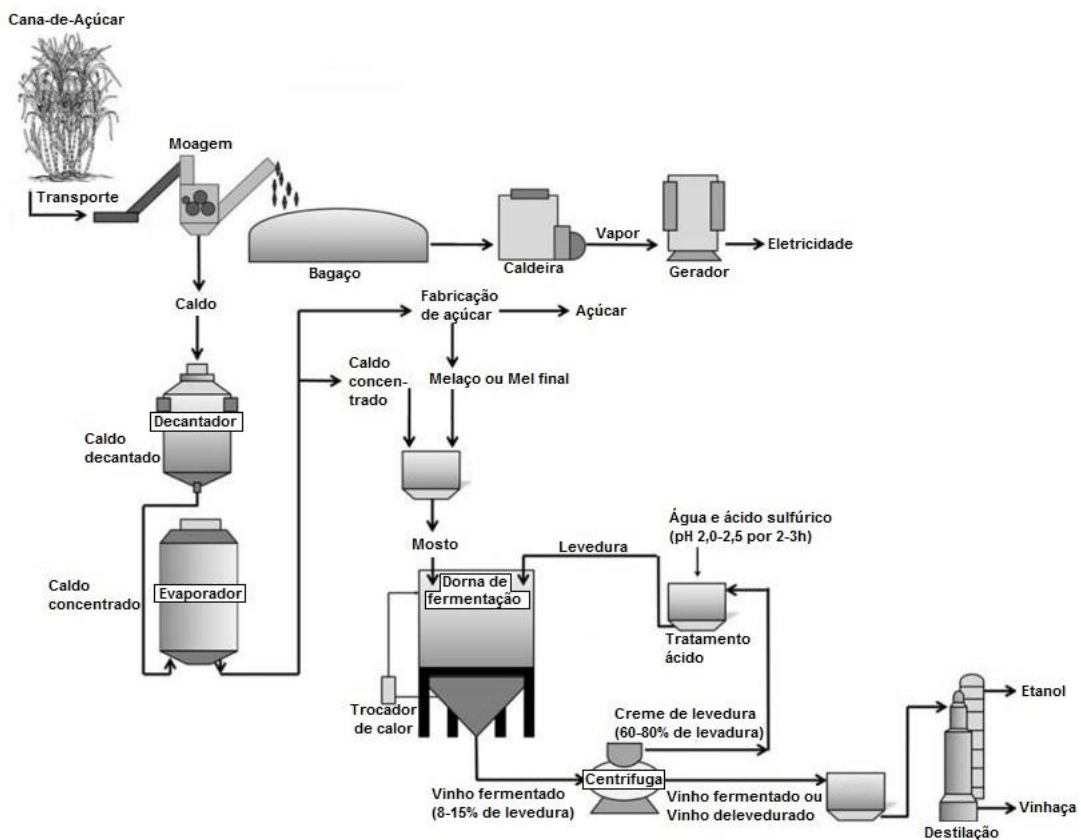
O sistema fermentativo Melle-Boinoit foi desenvolvido na década de 1930 pelo engenheiro Firmin Boinot nas Usinas de Melle na França, esse processo opera inicialmente com elevada concentração do inóculo, isso faz com que as leveduras não gastem energia na multiplicação celular. Esse sistema se caracteriza também na recuperação das células do vinho por centrifugação e no tratamento químico que recebem para ser novamente utilizadas nas próximas fermentações, sendo a recuperação do fermento em torno de 90 %. A densidades celulares dentro das dornas é entre 10 e 17 % (m/v), favorecendo para uma fermentação com o tempo mais curto (BASSO *et al.*, 2008; LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011).

As vantagens do processo Melle-Boinoit é a alta eficiência fermentativa e maior parâmetro de produtividade comparado com os demais processos, além de ter menor perda de fermento e menor tempo na etapa de fermentação. O processo permite trabalhar com meios fermentativos mais concentrados e não há necessidade de renovar o inóculo, caso não haja problemas com contaminações (VASCONCELOS, 2010).

#### 2.1.4. Etapas do Processo

O processo simplificado apresentado na Figura 1, conforme Amorim *et al.* (2011), denota-se o sistema industrial para beneficiamento da cana-de-açúcar no Brasil, onde cerca de 90 % das destilarias estão ligadas a fábricas de etanol e açúcar, e em muitas destilarias usam bagaço de cana para produzir o vapor necessário para operar a fábrica.

**Figura 1** - Esquema simplificado do processo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2011)

##### *i. Limpeza e Preparação*

O recebimento da cana-de-açúcar nas usinas sucroalcooleira é feito por mesas alimentadoras, a matéria-prima é transportada para serem primeiramente lavadas, pois a limpeza tem a finalidade de retirar impurezas provenientes do campo, como terra, areias e fuligem. Após a lavagem, a cana é levada para um conjunto de facas rotativa e desintegradores para romper a estruturas dos colmos e para facilitar e aumentar a eficiente da extração do caldo (LIMA; MARCONDES, 2012).

## *ii. Moagem*

Os colmos da cana-de-açúcar são esmagados por cilindros das moendas, durante a extração, o caldo obtido da primeira moenda, que corresponde 50 a 70% da extração, e denominado de caldo primário, e o caldo proveniente da extração das demais moendas é o caldo secundário. O caldo primário tem o teor de ATR (Açúcares Totais Recuperáveis) mais elevado, portanto é mais adequado para fabricação de açúcar comercial (CARVALHO, 2010), que após sofrer um tratamento, uma evaporação e uma cristalização para produção do açúcar, o resíduo (mel final ou melaço) juntamente com o caldo secundário são utilizados na fabricação do etanol, esse produto ainda é um excelente substrato para a fermentação alcoólica (LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011; LIMA; MARCONDES, 2012).

## *iii. Tratamento do Caldo*

As etapas posteriores a extração são os tratamentos do caldo com o peneiramento, calagem, aquecimento e decantação. O peneiramento remove impurezas como bagacilho e areia, já o tratamento químico denominado de calagem evita a inversão e degradação da sacarose corrigindo o pH utilizando o leite de cal. O aquecimento consiste em elevar a temperatura do caldo a 103 °C – 105 °C para reduzir a contaminação microbiana, e então passar pelo último tratamento nos decantadores, a clarificação. Os objetivos do processo de clarificação são a máxima eliminação impurezas solúveis, de dispersões coloidais, moleculares e iônicas, após essas etapas obtendo-se o mosto para realizar a fermentação (LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011; LIMA; MARCONDES, 2012).

## *iv. Fermentação*

O processo fermentativo ocorre em tanques de aço denominados de dornas de fermentação, esses tanques possuem refrigeração para conduzir o processo fermentativo na faixa de 28 °C a 30 °C. Após um tempo de 4 a 12 horas, a fermentação termina gerando um produto final de teor alcoólico entre 7 % e 10 %, denominado de vinho fermentado ou vinho levedurado (LIMA; MARCONDES, 2012).

## *v. Centrifugação e Tratamento do Fermento*

As leveduras do processo fermentativo são separadas do vinho levedurado para a reutilização em fermentações subsequentes. A recuperação dessas células é realizada mediante uma centrifugação. O vinho separado, livre das células de leveduras, é chamado de

vinho centrifugado ou vinho delevurado, após essa etapa, o vinho é finalmente encaminhado para a destilação. A levedura recuperada (creme de levedura) sofre um tratamento antes de retornar ao processo. Este tratamento consiste na adição de água e de ácido sulfúrico gerando uma mistura conhecida como pé-de-cuba (LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011).

#### vi. Destilação

O vinho fermentado é composto basicamente por etanol entre 7 % e 10 % e a água entre 89 % e 93 %, os demais componentes são encontrados em quantidades menores. Nesse processo de destilação, o líquido é colocado em colunas é aquecido até a evaporação do componente mais volátil, nesse caso o álcool etílico. Na evaporação, seguida da condensação, é obtido o etanol hidratado, usado como combustível, com residual de umidade de até 5 %. Para a produção do etanol anidro é necessária uma etapa adicional devido a formação do fenômeno azeótropo da água residual com o etanol, podendo ser a destilação azeotrópica, destilação extrativa ou a destilação com peneiras moleculares (MACHADO; ABREU, 2006; LIMA; MARCONDES, 2012).

## 2.2. Fermentação Alcoólica

### 2.2.1. Microrganismos da Fermentação

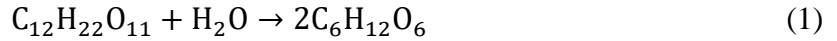
A produção industrial de etanol é comumente realizada utilizando leveduras como microrganismo da fermentação, destacam-se como produtoras de etanol a partir de diferentes tipos de açúcares os gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharamyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009; AZHAR *et al.*, 2017). As leveduras são microrganismos unicelulares, heterotróficos e anaeróbios facultativos, ou seja, crescem na presença e na ausência de oxigênio, porém é na condição de anaerobiose que a produção de etanol é maior e que há pouca formação biomassa (VASCONCELOS, 2010). A espécie mais importante de levedura alcoólica historicamente é a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo utilizada há muito tempo na fabricação de pães e bebidas alcoólicas. Essa espécie possui a capacidade de transformar rapidamente açúcares em etanol, tem alta tolerância alcoólica, osmotolerância, suporta grandes variações de temperatura e apresenta atividade celular em ambiente ácido (ANDRIETTA *et al.*, 2007).

Entretanto, nas últimas três décadas também têm sido intensamente estudada a bactéria *Zymomonas mobilis* como produtora de etanol, essa bactéria vem despertando o interesse devido ao rendimento ser cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose e a velocidade de conversão ser três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, apesar dessas vantagens, o rendimento fermentativo da *Zymomonas mobilis* diminui quando se utiliza na fermentação a sacarose como substrato, isso ocorre devido à formação de subprodutos como levana e sorbitol. (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

Atualmente no processo fermentativo brasileiro predominam as linhagens das *Saccharomyces cerevisiae* que foram selecionadas nos anos 90 através de monitoramentos utilizando a técnica de cariotipagem. Essas cepas selecionadas foram avaliadas em laboratórios e reintroduzidas nas destilarias para comprovar sua capacidade fermentativa, as cepas foram identificadas com as iniciais das unidades de origem, por exemplo, BG-1 (Usina Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciugal), SA-1 (Usina Santa Adélia), CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra) CL (Usina Clealco), entre outras. As linhagens PE-2 e CAT-1 tem mostrado alta taxa de persistência e dominância na indústria, e representam 80 % da comercialização de cepas iniciadoras da fermentação no Brasil (ANDRIETTA *et al.*, 2007; BASSO *et al.*, 2008; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011; AMORIM *et al.*, 2011). Além disso, com o uso da biologia molecular, várias linhagens de levedura ainda vêm sendo estudadas e desenvolvidas para produção de etanol, incluindo leveduras híbridas, recombinantes e selvagens (AZHAR *et al.*, 2017).

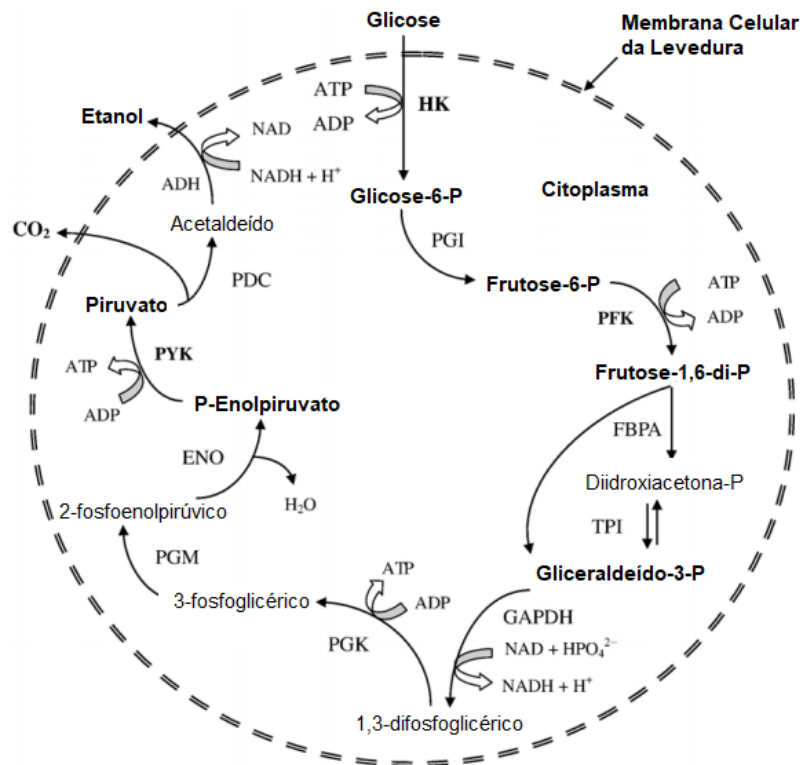
### 2.2.2. Processo Bioquímico

A fermentação alcoólica é um processo biológico de catabolismo anaeróbio na qual a levedura utiliza substrato fermentável para a produção de energia na forma de ATP ou outros compostos de transferência de energia para a biossíntese do material celular e produção do etanol (VOLPE, 1996; LIMA; MARCONDES, 2002). O substrato fermentável são os açúcares, especialmente as hexoses como a glicose. A sacarose presente no mosto da cana-de-açúcar é hidrolisada pela invertase, enzima produzida pela levedura, convertendo em duas moléculas de hexoses, sendo uma molécula de glicose e outra de frutose. Na reação química, 1 grama de sacarose fornece 1,0526 gramas de hexose, isso acontece devido a incorporação de água, conforme equação estequiométrica a seguir (LOPES; GABRIEL; BORGES, 2011).



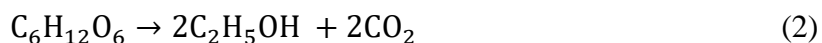
A principal via catabólica para a fermentação das hexoses é o glicólise (Embden-Parnas-Meyerhof), a mesma envolve uma série de reações enzimáticas independentes. O primeiro estágio de reações é a fosforilação da glicose até a conversão em frutose-1,6-difosfato, consumindo duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato). Essa molécula, no segundo estágio, é separada em diidroxiacetona fosfato e em gliceraldeído-3-fosfato. O terceiro estágio é fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato pela adição de uma molécula de fosfato inorgânico, possibilitando a formação do ácido 3-fosfoglicérico e a síntese de duas moléculas de ATP, posteriormente, a molécula de ácido 3-fosfoglicérico converte para 2-fosfoenolpirúvico pela ação de uma enzima chamada fosfogliceromutase. A formação do piruvato ocorre no quarto estágio da glicólise, com a formação do enolpiruvato e duas moléculas de ATP a partir do 2-fosfoenolpirúvico (MADIGAN, 2016; CROCOMO; GUTIERREZ, 2001).

**Figura 2** - Síntese do etanol na célula de levedura. Abreviações: HK – Hexoquinase, PGI – Fosfoglicomutase, PFK – Fosfofrutoquinase, FBPA - Frutose difosfato aldolase, TPI – Fosfotrioseisomerase, GAPDH – Gliceraldeído fosfato desidrogenase, PGK - Fosfogliceroquinase, PGM – Fosfogliceromutase, ENO – Enolase, PYK – Quinase pirúvica, PDC – Descarboxilase pirúvica e ADH – Desidrogenase alcoólica.



Fonte: BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG (2008).

Dessa madeira, o saldo final da glicólise são dois moles de ATP por mol de glicose consumido. Por fim, ocorre a descarboxilação do piruvato e o acetaldeído é reduzido a etanol com produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (MADIGAN, 2016; CROCOMO; GUTIERREZ, 2001).



A relação estequiométrica acima, conhecida como equação de Gay-Lussac, estabelece a relação teórica que 1 grama de hexose possa produzir 0,511 grama de etanol e 0,489 grama de dióxido de carbono. Em termos da sacarose esse mesmo cálculo pode ser realizado levaremos em consideração a relação estequiométrica da Equação 1, portanto 1 grama de sacarose fornece 1,0526 gramas de hexose que por sua vez fornece 0,5379 grama de etanol.

Porém a conversão não ocorre por completo por diversos fatores de estresse celular, aproximadamente 5 % do açúcar é consumido pela levedura para a formação de compostos intermediários (LIMA; MARCONDES, 2002). O glicerol é um desses compostos, e a formação deste ocorre a partir de um desvio da fosfodiidroxiacetona da glicólise devido a produção de biomassa. Outros subprodutos da fermentação são os ácidos orgânicos como o succínico e o acético (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001; AMORIM *et al.*, 2011).

### 2.2.3. Rendimento Fermentativo Industrial

A fermentação alcoólica é um procedimento bem conhecido, no entanto há diferentes fatores que interferem na produtividade de etanol na indústria. As cepas industriais sofrem várias condições de estresse impostas pelo próprio processo, tais como altos teores de etanol, alta pressão osmótica, baixo pH, alta temperatura e outros, que segundo Basso *et al.* (2011), todos esses fatores são intensificados pela prática de recuperação do fermento.

#### *i. Agentes Inibidores*

A fermentação produz uma série de compostos que podem atuar como inibidores a levedura, mas também substâncias presentes no mosto podem causar a redução na viabilidade celular, como potássio, cálcio e alumínio em quantidades excessivas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; BASSO *et al.*, 2008).

Contudo, o principal composto inibidor é o etanol, visto que é o metabólito produzido em maior quantidade durante o processo fermentativo. O etanol pode ser tóxico em determinadas concentrações, dependem de condições como temperatura e tempo de fermentação, em geral, a atividade das células cessa em concentrações acima de 110 g.L<sup>-1</sup> de etanol. Por essa razão, a indústria busca por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com maiores tolerâncias ao etanol (LIMAS; MARCONDES, 2002; SILVA *et al.* 2008). O álcool afeta algumas enzimas chave na via glicolítica das células, além de comprometer o consumo de nutrientes diminuindo a atividade da membrana plasmática, isso porque os ácidos graxos da membrana neutralizam a inibição do etanol alterando a permeabilidade das membranas plasmáticas, assim com o sistema de transporte de açúcares (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

#### *ii. Acidez e pH*

Durante a fermentação a levedura pode ser inibida pelos ácidos produzidos por microrganismos concorrentes. Além disso, a permeabilidade de alguns nutrientes essenciais nas células é influenciada pela concentração de H<sup>+</sup> no caldo, com isso, o rendimento fermentativo pode ser afetado. O meio com pH não ideal pode favorecer a contaminação bacteriana, a baixa taxa de fermentação e a alta formação de subprodutos (AZHAR *et al.*, 2017).

Sendo assim, o pH pode ser usado para selecionar o crescimento preferencial das leveduras sobre as bactérias (SOUSA; MONTEIRO, 2011), uma vez que as leveduras são microrganismos acidófilos e a faixa de pH para obtenção dos melhores resultados fermentativos está entre 4,0 e 4,5 (VASCONCELOS, 2010). De acordo com Staniszewski *et al.* (2007), quando o pH é inferior a 4,0, é necessário um período de incubação mais longo, mas a concentração de etanol não é reduzida significativamente, no entanto, quando o pH está acima de 5,0, a concentração de etanol reduz substancialmente.

Valores baixos de pH influenciam também a inversão da sacarose, uma vez que o ácido sulfúrico, utilizado no tratamento do fermento, ativa o processo de inversão tornando o mais fácil para as leveduras fermentarem a glicose e a frutose (VASCONCELOS, 2010).

#### *iii. Temperatura*

A taxa de crescimento de microrganismos é diretamente afetada pela temperatura, as leveduras são microrganismos mesófilos e a temperatura adequada para conduzir uma

fermentação é entre 26 °C e 35 °C. Porém a fermentação é uma reação exotérmica, e um processo sem o controle adequado, a temperatura pode chegar a 38 °C. A temperatura elevada pode aumentar o efeito inibidor do etanol sobre as células de leveduras, pode favorecer a contaminação bacteriana e ter perdas do etanol por evaporação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; VASCONCELOS, 2010). Além disso, as enzimas que regulam a atividade microbiana durante processo de fermentação são sensíveis a alta temperatura, o que pode desnaturar sua estrutura terciária e inativar as enzimas. Dessa maneira, a temperatura é cuidadosamente regulada durante todo o processo de fermentação (AZHAR *et al.*, 2017).

#### *iv. Substrato*

O uso da concentração adequada de substrato leva ao aumento da velocidade de fermentação, da produtividade, de menores quantidades de biomassa e menor formação de glicerol. A fermentação alcoólica com alta concentração de açúcares expõe a levedura a estresses como pressão osmótica e forte inibição pelo etanol, podendo inibir o metabolismo celular (VASCONCELOS, 2010; PHUKOETPHIM *et al.*, 2017).

Em teoria, a concentração de açúcar necessária para resultar em 12 % de etanol seria em torno de 20 % (m/v) de ART, considerando um rendimento de etanol de 90 %. Porém, a concentração ideal para o mosto é de 12 °Brix a 16 °Brix (LIMA; MARCONDES, 2002; BASSO *et al.*, 2011).

#### *v. Oxigênio*

A levedura tem características facultativas a respeito da utilização do oxigênio, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência como na presença de oxigênio. O oxigênio é essencial para a multiplicação celular, contudo, para o processo fermentativo, a condição de anaerobiose é mais adequada para maior produtividade de etanol. O excesso de oxigênio pode levar a oxidação de lipídios da membrana mitocondrial (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; VASCONCELOS, 2010).

#### *vi. Agitação*

A agitação mecânica durante o processo fermentativo, quando conduzida adequadamente, contribui para o aumento da eficiência fermentativa, pois reduz o efeito de inibição do etanol nas células, diminui o gradiente de temperatura, mantém as leveduras em suspensão e reduz o tempo da fermentação proporcionando o contato mais eficiente entre a

levedura e o substrato. A taxa de agitação comum para fermentação é de 150 rpm a 200 rpm, e a taxa não adequada pode causar limitação às atividades metabólicas das células, visto que, quando conduzida na rotação correta, a agitação controla a permeabilidade de nutrientes do caldo para dentro das células e remoção de etanol para meio (VASCONCELOS, 2010; AZHAR *et al.*, 2017).

#### *vii. Floculação Celular*

A floculação celular é um mecanismo natural de formação de conglomerados de células com massa muito superior ao da célula individualizada. Esse conglomerado reduz a superfície de contato entre as células e o meio, comprometendo a conversão de açúcar em etanol, além disso, as células floculantes podem decantar no fundo dos fermentadores deixando açúcares residuais no vinho sem fermentação e aumentando assim o tempo de fermentação (SOUZA; MUTTON, 2004; AMORIM *et al.*, 2011; BASSO *et al.*, 2011).

A floculação das células de levedura é provocada tanto por bactérias como por leveduras contaminantes (LUDWING; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001). O mecanismo de floculação no processo fermentativo afeta o desempenho industrial, principalmente das unidades que utilizam o sistema de recuperação de células por centrifugação, pois ocorrem perdas excessivas de células (SOUZA; MUTTON, 2004). Já no sistema de recuperação do fermento, processo que predomina de fermentação alcoólica no Brasil, a floculação reduz a eficiência da centrifugação e o creme de levedura fica menos concentrado, contendo assim mais vinho. Assim que o creme de levedura vai para o tratamento com ácido sulfúrico, é necessário adicionar mais ácido para reduzir o pH, pois o vinho presente tem capacidade tampão, com isso, o tratamento pode levar as leveduras ao estresse ácido, com isso podem reduzir sua atividade ou morrer (AMORIM *et al.*, 2011). Com redução de células viáveis, há um gasto maior de substrato como a reposição celular, comprometendo assim o rendimento alcoólico (LUDWING; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

#### *viii. Contaminação Bacteriana*

A contaminação bacteriana tem sido um problema na produção industrial do etanol, devido as grandes dimensões do processo de fermentação e as condições de assepsia serem de difícil alcance. Dependendo da intensidade, a contaminação bacteriana compromete o rendimento fermentativo devido as bactérias competirem com as leveduras pelo substrato e formar metabólitos bacterianos prejudiciais ao desempenho fermentativo das leveduras, como

a formação de ácidos orgânicos, polissacarídeos e biofilmes gomosos, resultando em formação de espuma e baixa viabilidade da levedura (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001, BASSO *et al.*, 2011; BREXÓ; SANT'ANA, 2017). De acordo com Brexó e Sant'ana (2017), a redução do rendimento no processo fermentativo pode chegar a 30 % devido a contaminação microbiana.

Altas temperaturas favorecem o crescimento de bactérias, assim como o aumento do tempo de fermentação e as condições de estresses da levedura. (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). A maioria dos contaminantes bacterianos são bactérias do ácido láctico, como as espécies *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus*, devido à sua maior capacidade dessas bactérias em lidar com os baixos valores de pH e altas concentrações de etanol em comparação com outros microrganismos (BASSO *et al.*, 2011; ANDRIETTA *et al.*, 2007).

### **2.3. Biodiversidade das Leveduras**

A população microbiana durante as fermentações industriais costuma ser bastante dinâmica, da mesma maneira que as destilarias permitem a entrada de bactérias contaminantes no processo, permitem também a entrada de leveduras selvagens (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*). Durante a produção de etanol pode ocorrer a substituição da levedura do processo por essas leveduras selvagens, tanto de linhagens da própria espécie como de outras espécies. Isso porque o processo de batelada alimentada com o reciclo de células favorece a proliferação de alguns gêneros contaminantes, e a reciclagem de células exerce uma pressão seletiva, levando às cepas com maior tolerância às condições estressantes da fermentação (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; BASSO *et al.*, 2008; CECCATO-ANTONINI, 2012).

Dessa forma, o monitoramento dessas leveduras selvagens é um componente essencial do gerenciamento do processo de fabricação de etanol, através do monitoramento podem ser observadas dominância e a persistência das cepas selvagens e serem posteriormente selecionadas e empregadas como cepas iniciais (BASÍLIO *et al.*, 2008; BASSO *et al.*, 2011;). O estudo realizado por Basso *et al.* (2008) demonstrou a dinâmica populacional das leveduras em 70 destilarias do Brasil por um período de 12 anos, onde as cepas com dominância e persistência foram identificadas por cariotipagem, isoladas e avaliadas em rendimento de etanol, formação de glicerol e espuma, viabilidade durante a reciclagem e capacidade de implantação em fermentadores industriais, assim foram isoladas 340 diferentes cepas

selvagens, as cepas não-*Saccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera bruxellensis* e *Candida krusei*, representaram menos de 5 % do total isolado. A maioria das linhagens, mesmo apresentando dominância e persistência, apresentou características indesejáveis na fermentação, como formação excessiva de espuma, alta taxa de sedimentação, e apenas 14 cepas apresentavam parâmetros desejáveis para a fermentação, e as cepas que apresentaram melhor desempenho com suas capacidades de implantação foram as linhagens PE-2, CAT-1 e VR-1.

Em outro estudo realizado numa destilaria brasileira constatou a presença de uma flora de levedura diversificada nas amostras de caldo e mosto da cana-de-açúcar, obteve-se 72 isolados e identificados em 4 gêneros, sendo eles: *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. Já na amostra do fermento tratado o estudo mostrou que o gênero *Saccharomyces* representou 88 % dos isolados e o gênero *Candida* os 12 % restantes (Cabrini; Gallo, 1999).

### 2.3.1. Principais Técnicas de Identificação de Leveduras

A estratégia para monitorar a dinâmica das leveduras ao longo do processo para garantir a qualidade e reprodutibilidade da fermentação é a identificação dessas espécies de leveduras. Mesmo concordando-se que a abundância de espécies é central para a caracterização da biodiversidade, a diversidade genética é uma característica essencial para a própria espécie, podendo ser diferenciada desde técnicas simples ou mais elaboradas (LACHANCE, 2006).

A técnica convencional de identificação é a taxonomia clássica, e consiste em classificar leveduras por meio de suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. O método de taxonomia clássica de leveduras diferencia as culturas a nível de gênero por testes morfológicos (formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro, reprodução vegetativa, formação de endósporos e balistósporos), sexuais (presença ou ausência de ascósporos) e de cultura (crescimento em meio sólido e líquido).

Já para identificação a nível de espécie são necessários testes fisiológicos, como a utilização de carboidratos, utilização de compostos nitrogenados, crescimento em meio isento de vitaminas, utilização e produção de ácidos, produção de compostos amiláceos extracelulares, hidrólise da ureia, degradação de lipídeos, produção de éster, resistência à actidione e outros. A eficiência da taxonomia clássica é limitada quando há a necessidade de

identificar leveduras da mesma espécie, pois possuem características semelhantes e não há discriminação intraespecífica nesse método. Devido a isso, utilizam-se as técnicas de biologia molecular, que apesar de demandarem equipamentos e reagentes caros, têm sido conclusivas na identificação de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (CECCATO-ANTONINI, 2012).

As técnicas de biologia molecular são baseadas na análise de polimorfismos moleculares. Os polimorfismos são variações genéticas que podem ocorrer em sequências codificadoras e não codificadoras do DNA, levando a variações fenotípicas. As técnicas mais utilizadas são a cariotipagem, a técnica de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), reação de polimerização em cadeia (PCR), e o Polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA mitocondrial (RFLP/mtDNA). A Cariotipagem por meio da eletroforese em campo pulsado baseia-se em observações microscópicas de preparações de cromossomos na mitose ou meiose. Já a PCR permite à amplificação *in vitro* de sequência específica de DNA em até um bilhão de vezes, para isso, o método envolve nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras (primers) e uma DNA polimerase termoestável. A técnica de RAPD é basicamente uma variação da técnica de PCR, diferenciando-se apenas por utilizar um primer único, de sequência pequena, desenhado aleatoriamente e que poderá amplificar diferentes regiões do genoma ao acaso, dessa forma a técnica que pode ser utilizada para caracterizar um organismo individual (CECCATO-ANTONINI, 2012; ALCOBA-FLÓREZ *et al.*, 2007).

A técnica de polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição do DNA mitocondrial (RFLP/mtDNA) tem sido bastante utilizada no acompanhamento da dinâmica de populações de leveduras, o método explora a ampla variabilidade do tamanho do DNA mitocondrial (entre 6 a 25  $\mu$ m). O uso de DNA mitocondrial apresenta vantagens devido ao alto número de moléculas por célula e um único cariótipo mitocondrial em cada isolado (ALCOBA-FLÓREZ *et al.*, 2007). Essa técnica é baseada na diferença no conteúdo de GC (Guanina-Citosina) entre o DNA nuclear (nDNA) e o mtDNA, sendo de 40 % e 20 %, respectivamente. Assim, a enzima de restrição utilizada (como MspI, HaeIII, CfoI, HinfI e AluI) reconhecem regiões ricas em GC, e o DNA nuclear fica superdigerido, dando origem a um alto número de fragmentos pequenos que não são detectados pela eletroforese convencional em gel de agarose. Dessa forma, somente os fragmentos de DNA mitocondrial serão observados no gel, os quais serão separados por tamanho, constituindo padrões específicos para as espécies e linhagens (ALCOBA-FLÓREZ *et al.*, 2007; CECCATO-ANTONINI, 2012).

### 2.3.2. Interações entre Micro-organismos

A utilização de mais de uma cepa de levedura iniciadora da fermentação é comum na destilaria de etanol, a incubação de cepas especificadas em condições assépticas é conhecida como co-cultura. O sistema em co-cultura pode ser vantajoso em relação a utilização de um único microrganismo e resultar em maiores rendimentos fermentativos, isso devido ao potencial de utilização sinérgica das vias metabólicas de todas as cepas inoculadas. No entanto, a presença de leveduras selvagens (não especificadas) na fermentação é definida como cultura mista, e a presença de diferentes micro-organismos podem levar a ação simbiótica dos mesmos para desenvolver mecanismos de sobrevivência (BADER *et al.*, 2010).

Portanto, o monitoramento das leveduras presente nas dornas de fermentação é de extrema importância, visto que as interações desses micro-organismos podem também ter efeitos antagônicos sobre as cepas iniciadoras. Certas cepas de *Saccharomyces* secretam uma toxina proteica chamada zimocida, ou toxina “killer”, que é letal para outras cepas de *Saccharomyces*. A atividade killer das *Saccharomyces* é determinado pela presença de fita dupla de RNA (dsRNA - *double stranded RNA*), e uma levedura selvagem produtora de toxina “killer” pode ter um impacto negativo sobre a produção de etanol (RUSSELL, 2003; EL-BANNA; MALAK; SHEHATA, 2011).

Para Lopes *et al.* (2015) outro assunto promissor na interação e competição de levedura é a epigenética, que é um processo de regulação dos genes que acontece durante a divisão celular, que não envolve uma mudança na sequência do DNA, esse processo é capaz de mudar o comportamento das leveduras, eventualmente levando-as a exibir características diferentes das esperadas para uma linhagem. Os fenômenos epigenéticos diferem dos processos genéticos convencionais com relação a reversibilidade e a resposta direta as influências ambientais. No entanto, poucos casos foram relatados para linhagens de leveduras industriais (MULLER; PRADO, 2008; LOPES *et al.*, 2015).

Dessa forma, há a urgência para estudar os mecanismos de interação, seleção e evolução de leveduras, uma vez que apenas uma pequena parte da biodiversidade da levedura é conhecida e a população durante as fermentações industriais costuma ser bastante dinâmica (LACHANCE, 2006; CECCATO-ANTONINI, 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a contaminação microbiana no processo fermentativo de uma usina sucroalcooleira no estado de Goiás e estudar a predominância de uma cepa de levedura floculante selvagem em fermentações de cultura mista com linhagens industriais do gênero *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

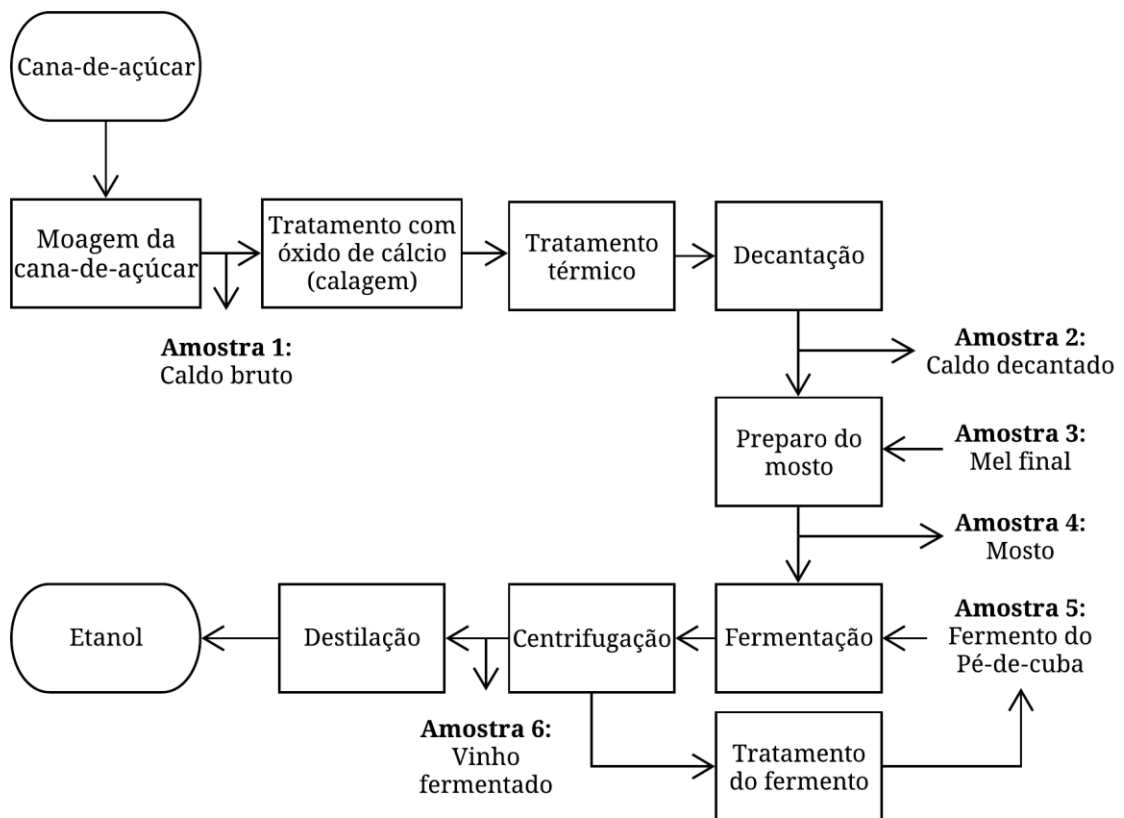
- Isolar leveduras contaminantes predominantes no caldo bruto, caldo decantado, mosto, mel final, fermento do pé-de-cuba e vinho fermentado do processo fermentativo de uma usina no estado de Goiás;
- Comparar a produção de etanol, biomassa, glicerol, ácido acético e consumo de açúcares das leveduras isoladas e das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2;
- Estudar a competência das cepas BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 com diferentes porcentagens de levedura floculante selvagem predominante em fermentações utilizando mosto sintético de cana-de-açúcar;
- Monitorar a dinâmica populacional ao longo de dez fermentações consecutivas com reutilização de inóculo de cultura mista de levedura floculante selvagem, BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2;
- Quantificar a concentração de cálcio no mosto utilizado em uma usina do estado de Goiás;
- Estudar a competência das cepas PE-2 com a cepa de levedura floculante selvagem em mosto sintético de cana-de-açúcar adicionado de diferentes concentrações de cálcio.

#### 4. METODOLOGIA

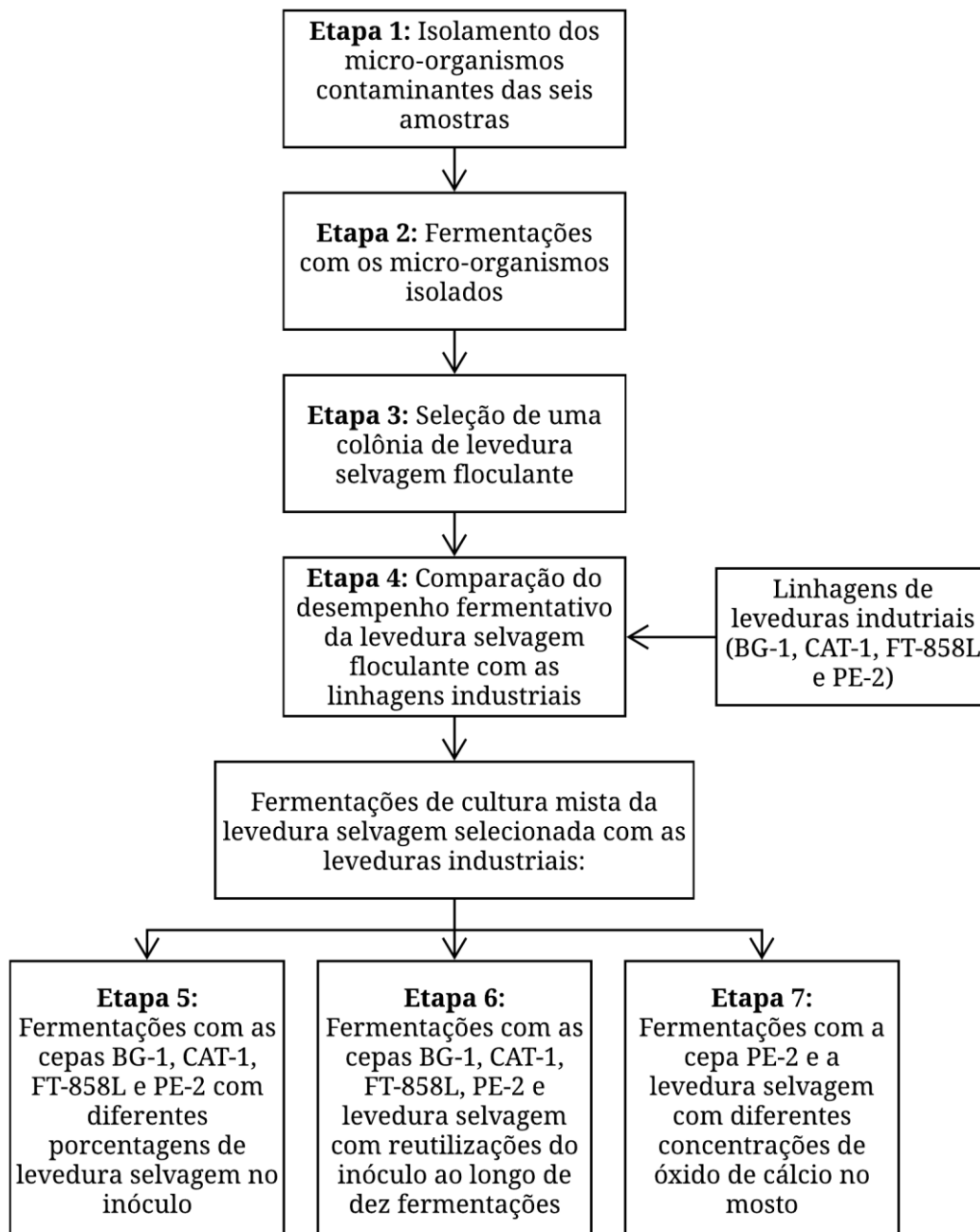
O estudo foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica na Escola de Engenharia de Alimentos, localizado na Universidade Federal de Goiás no *campus* Samambaia em Goiânia - GO.

As amostras foram coletadas do processo de produção de etanol, cedidas por uma usina localizada no estado de Goiás. As amostras coletadas foram o mel final, mosto, caldo bruto, caldo decantado, vinho fermentado e o fermento do pé de cuba. O fluxograma do processo da usina e os seis pontos coletados estão na Figura 3, e as etapas de execução da pesquisa seguiram-se conforme o fluxograma apresentado na Figura 4.

**Figura 3** - Fluxograma do processo produtivo da usina de etanol e os locais de coleta das seis amostras.



**Figura 4** - Fluxograma com as descrições das etapas executadas na pesquisa.



#### 4.1. Isolamento, Micro-organismos e sua Manutenção

Inicialmente foram feitos isolamentos dos micro-organismos presentes nas seis etapas do processo de produção de etanol mencionadas anteriormente. As amostras foram diluídas de maneira a obter colônias isoladas, sendo uma alíquota de 0,1 mL transferida para placa de

Petri com meio GPY (Tabela 1) e incubadas em BOD a 30 °C por 48 horas. Após o período de incubação, foram feitas as contagens nas placas em unidade formadora de colônia por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>) conforme metodologia descrita por Ceccato-Antonini (2010).

$$\text{UFC.mL}^{-1} = \frac{\text{Número de colônias} \times \text{Diluição}}{0,1 \text{ mL}} \quad (3)$$

Pelo menos 30 colônias foram repicadas com auxílio de uma alça de platina e armazenadas no banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Goiás. Além das leveduras isoladas, também foram utilizadas as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, do banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica.

A manutenção das leveduras para conservação e viabilidade das células foram feitas utilizando os meios de cultura estéreis descritos nas Tabela 1 e Tabela 2.

**Tabela 1** - Meio de cultura GPY para manutenção das leveduras.

<b>Componentes do Meio</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
D-(+)-Glicose Anidra P.A.	20
Peptona	5
Extrato de Levedura	5
Ágar-Ágar	15

**Tabela 2** - Meio de cultura GPY líquido para manutenção das leveduras.

<b>Componentes do Meio</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
D-(+)-Glicose Anidra P.A.	20
Peptona	5
Extrato de Levedura	5

## 4.2. Preparo do Mosto Sintético

Para melhor reprodutividade dos experimentos foi utilizado mosto sintético de cana-de-açúcar com aproximadamente 16 % de açúcares (m/v), conforme Anexo A. O mosto foi preparado com padrões analíticos de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e sais minerais. Os nutrientes foram solubilizados em água destilada nas concentrações descritas no Anexo A e após essa etapa ajustou-se o pH com NaOH para 4,0. Em seguida o

mosto foi esterilizado por filtração a vácuo com membrana com poros de 0,22 µm de diâmetros da marca Merck Millipore® Stericup® e conservado a 4 °C até o momento do uso.

### 4.3. Fermentações

As fermentações foram conduzidas em triplicatas em tubos de ensaio estéreis de 10 mL e o volume útil foi 2 mL com mosto sintético de cana-de-açúcar (Item 4.2). Os ensaios foram conduzidos sob agitação de 50 rpm com os tubos inclinados em 60°, na temperatura de 30 °C, durante 72 horas. O período de incubação foi determinado após testes prévios para atingir a fase estacionária da curva de crescimentos das leveduras nessas condições.

O preparo do inóculo para as fermentações foram feitas a partir da raspagem das cepas presentes nas placas de manutenção e transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 mL contendo 1 mL de meio GPY líquido. Os tubos foram incubados a 30 °C por 12 horas. Após esse período, foi feita a centrifugação a 1075 g por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu as células em 1 mL de água destilada estéril. Para garantir o mesmo número de células iniciais em todos os experimentos, ajustou-se a concentração celular em 0,1 g.L<sup>-1</sup>, a partir da construção previa da curva padrão que correlaciona à absorbância a 600 nm (Equações 4, 5, 6, 7 e 8), como descrito no Item 4.4.

No final do tempo de 72 horas de fermentação, foram coletadas amostras para avaliação da concentração celular das leveduras bem como a concentração de açúcar residual, etanol, glicerol, e ácido acético. Ao final das fermentações de cultura mista foram avaliadas também as competências das cepas conforme Item 4.8.

#### 4.3.1. Ensaio Fermentativos

A primeira etapa do trabalho foi a realização de ensaios fermentativos com micro-organismos contaminantes isolados do processo de produção para avaliação global daqueles potencialmente prejudiciais no processo de produção do etanol. Os parâmetros utilizados para essa avaliação foram consumo de açúcares, formação de etanol, ácido acético e glicerol. As fermentações foram com o número de colônias selecionadas de acordo com a Tabela 3 para viabilidade dos experimentos.

**Tabela 3** - Número de colônias de micro-organismos contaminantes selecionadas para as fermentações para os pontos coletados na usina.

<b>Amostras Coletadas</b>	<b>Nº de Colônias Selecionadas</b>
Mosto	22
Fermento do pé cuba	27
Mel final	10
Caldo Bruto	16
Vinho fermentado	34
<b>Total de Fermentações</b>	<b>109</b>

A partir das análises dos ensaios anteriores, avaliou-se o grau de contaminação de cada amostra da usina e selecionou-se uma colônia de levedura com característica de floculação com indícios de ser prejudicial ao processo fermentativo da usina. A levedura selecionada recebeu a nomenclatura LFS, e realizou-se fermentações de cultura mista da levedura floculante com as cepas de leveduras industriais em diferentes porcentagens, conforme descrito na Tabela 4.

**Tabela 4** - Proporções do inóculo para as fermentações com as cepas BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 com LFS. Concentração celular inicial das fermentações foram mantidas em 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

<b>Ensaio</b>	<b>Proporção</b>		<b>Ensaio</b>	<b>Proporção</b>	
	BG-1	LFS		FT-858L	LFS
<b>1</b>	0,98	0,02	<b>9</b>	0,98	0,02
<b>2</b>	0,90	0,10	<b>10</b>	0,90	0,10
<b>3</b>	0,80	0,20	<b>11</b>	0,80	0,20
<b>4</b>	0,70	0,30	<b>12</b>	0,70	0,30
	CAT-1	LFS		PE-2	LFS
<b>5</b>	0,98	0,02	<b>13</b>	0,98	0,02
<b>6</b>	0,90	0,10	<b>14</b>	0,90	0,10
<b>7</b>	0,80	0,20	<b>15</b>	0,80	0,20
<b>8</b>	0,70	0,30	<b>16</b>	0,70	0,30

Além desses ensaios, também foram feitas fermentações com reutilização do inóculo por dez fermentações consecutivas. Todas as fermentações foram mantidas a concentração celular inicial de 0,1 g.L<sup>-1</sup>, no entanto, o primeiro inóculo foi ajustado para as proporções de 30 % levedura floculante selvagem, 17,5 % BG-1, 17,5 % CAT-1, 17,5 % FT-858L e 17,5 % PE-2. Após o término de cada fermentação, uma alíquota padronizada com concentração

celular de 0,1 g.L<sup>-1</sup> foi transferida para novo mosto e iniciada nova fermentação. Este procedimento foi realizado até completar dez fermentações em série.

A usina de etanol em estudo utiliza óxido de cálcio (CaO) para o tratamento de calagem em concentração em torno de 0,3 g.L<sup>-1</sup> para evitar a degradação da sacarose do caldo. Com intuito de observar a influência de diferentes concentrações de cálcio no mosto com infecção de leveduras flocculantes, na Tabela 5 são apresentadas as condições utilizadas das culturas mistas de *S. cerevisiae* PE-2 e LFS em mosto sintético. Foi selecionada somente a cepa de levedura PE-2 para esses ensaios para viabilizar o número de fermentações, e a escolha dessa linhagem deu-se pela ampla utilização desta na produção de etanol no Brasil.

**Tabela 5** - Proporções dos inóculos nas fermentações com *S. cerevisiae* PE-2 e LFS em mosto sintético de cana-de-açúcar, acrescido de diferentes concentrações de óxido de cálcio. Concentração celular inicial igual a 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

Adição de Óxido de Cálcio no Mosto (g.L <sup>-1</sup> )	Proporção	
	PE-2	LFS
0,00	0,70	0,30
0,05	0,70	0,30
0,10	0,70	0,30
0,20	0,70	0,30
0,30	0,70	0,30

#### 4.4. Determinação da Concentração Celular

As concentrações celulares foram estimadas pela construção de curva de calibração que correlaciona massa celular seca com a absorbância a 600 nm. Esta curva foi construída a partir do crescimento das cepas em GPY líquido durante 12 h. Após este tempo o meio foi centrifugado e lavado, as células foram ressuspensa com água destilada e diluídas em diferentes concentrações para posterior leitura das absorbâncias. Nesta etapa, 1 mL da suspensão de células foi filtrada em sistema de filtração a vácuo utilizando filtros Merck MF-Millipore<sup>TM</sup> 0,45 µm. Em seguida os filtros com as biomassas foram secos em micro-ondas até peso constante. Na Tabela 6 são mostradas as curvas de calibração para cada uma das cepas utilizadas.

**Tabela 6** - Curva de calibração das cepas BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e LFS. Onde (y) é concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e (x) absorbância.

Cepa	Equação	R <sup>2</sup>
BG-1	$y = 0,4243x$ (4)	0,9313
CAT-1	$y = 0,2999x$ (5)	0,9839
FT-858L	$y = 0,5274x$ (6)	0,8712
PE-2	$y = 0,4070x$ (7)	0,9885
LFS	$y = 1,1739x$ (8)	0,9960
Micro-organismos contaminantes	$y = 0,5665x^*$ (9)	-

\*Para viabilizar o número de curvas dos demais micro-organismos contaminantes, foi utilizada uma curva com valores médios de concentração celular. A curva foi determinada com a média dos coeficientes angulares das Equações 4, 5, 6, 7 e 8.

#### 4.5. Determinação de Cálcio no Mosto da Usina

Para a investigação do teor de cálcio no mosto utilizado pela usina após o tratamento de calagem, a técnica empregada foi de acordo com Silva (2009) utilizando espectrometria de absorção atômica (AAS - *Atomic Absorption Spectrometry*), com o equipamento da marca PerkinElmer, modelo PinAAcle 900F.

#### 4.6. Determinação dos Metabólitos e Açúcares Residuais

A quantificação dos açúcares residuais, bem como do etanol, glicerol e ácido acético foi feita por cromatográfica líquida de alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). Após as fermentações as amostras foram centrifugadas a 1075 g por 2 minutos, o sobrenadante foi diluído e filtrado utilizando filtros Merck Millex-GP Filter com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  para então ser injetado no HPLC. O cromatógrafo utilizado foi da marca ©Shimadzu, modelo Prominence, com detectores de índice de refração (RID-20A) e UV-VIS (SPD-20A). A coluna utilizada foi a Shim-pack SCR 102HG protegida pela pré-coluna SCR 102HG com a temperatura do forno em 50 °C. A fase móvel utilizada foi solução de ácido perclórico 5 mM em fluxo de 0,600  $\text{mL.min}^{-1}$ .

#### 4.7. Cálculo dos Parâmetros Fermentativos

Por meio dos valores de concentração celular, residual de açúcares e concentração de etanol, foram calculados o fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ) e eficiência fermentativas ( $\eta$ ) por meio das Equações 10, 11, 12 e 13 respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (10)$$

Sendo:  $Y_{X/S}$  = Fator conversão de substrato a células ( $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$ );  $X_0$  = Concentração celular inicial ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $X_f$  = Concentração celular final ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $S_0$  = Concentração inicial do substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $S_f$  = Concentração residual do substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (11)$$

Sendo:  $Y_{P/S}$  = Fator de conversão de substrato em produto ( $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$ );  $P_f$  = Concentração final de etanol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $P_0$  = Concentração inicial de etanol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $S_f$  = Concentração final de substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $S_0$  = Concentração inicial de substrato ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

$$\emptyset = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (12)$$

Sendo:  $\emptyset$  = Produtividade ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $P_0$  = Concentração de etanol inicial ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $P_f$  = Concentração de etanol final ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $t_f$  = Tempo total de fermentação (h).

A Equação 1 e Equação 2 (equação de Gay-Lussac) estabelecem que o rendimento teórico com 1 grama de sacarose possa produzir 0,5379 grama de etanol e que 1 grama de hexose possa produzir 0,511 grama de etanol. Dessa forma, a eficiência fermentativa foi calculada pela relação do rendimento prático pelo teórico, considerando as proporções de hexoses e sacarose utilizadas no mosto sintético (Anexo A).

$$\eta = \frac{\text{Rendimento prático}}{\text{Rendimento teórico}} = \frac{P_f / (S_0 - S_f)}{(0,5379 \times 0,875) + (0,511 \times 0,125)} \times 100 = \frac{P_f / (S_0 - S_f)}{0,5354} \times 100 \quad (13)$$

Sendo:  $\eta$  = Eficiência fermentativas (%);  $P_f$  = Concentração de etanol final ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_0$  = Concentração inicial de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S_f$  = Concentração final de substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

#### **4.8. Análise da Competência das Linhagens Industriais**

Nos ensaios de cultura mista das linhagens industriais com a levedura floculante selvagem foram avaliadas as porcentagens finais de cada cepa pela técnica de identificação baseada nas características macromorfológicas de crescimento das colônias em placa. A utilização dessa técnica foi possível devido às características das colônias das leveduras floculantes serem bem distintas das características das colônias de linhagens industriais.

As porcentagens de crescimento das colônias em placa foram utilizadas como parâmetro para avaliar a competência das linhagens BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 sobre a levedura floculante selvagem. Realizou-se as fermentações conforme ensaios descritos no Item 4.3.1, e após o período de 72 horas de fermentação, coletou-se uma amostra de 20  $\mu\text{L}$  e ajustou-se a absorbância para 0,200 no espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm para obter um valor padronizado de células. Em seguida foram feitas diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$  com água destilada em microtubos. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-3}$  foi transferida para placa de Petri contendo meio GPY (Tabela 1) e espalhada com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas e após esse período foram feitas as visualizações e contagem das colônias.

#### **4.9. Análise Estatística**

Os resultados nos ensaios fermentativos das culturas isoladas foram agrupados utilizando análise de Cluster. O método consiste em procedimento de agrupamento hierárquico no qual a medida de similaridade usada para juntar agrupamentos é calculada como a soma de quadrados entre os dois agrupamentos feita sobre todas as variáveis. O software utilizado foi Minitab® 17, o procedimento aglomerativo foi pelo método de Ward e a medida de distância foi calculada utilizando o quadrado euclidiano e as variáveis padronizadas.

Para comparação de médias, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5 % de significância. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todas as análises tiveram seus resultados expressos pelo valor médio e desvio-padrão. Os softwares utilizados foram Microsoft Excel<sup>®</sup> 2016 e Statistica versão 7.0.

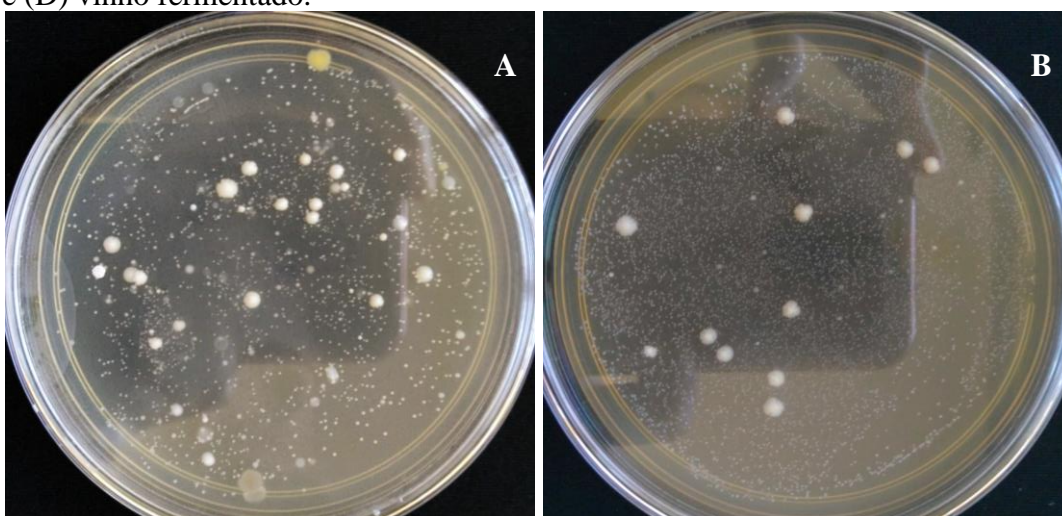
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

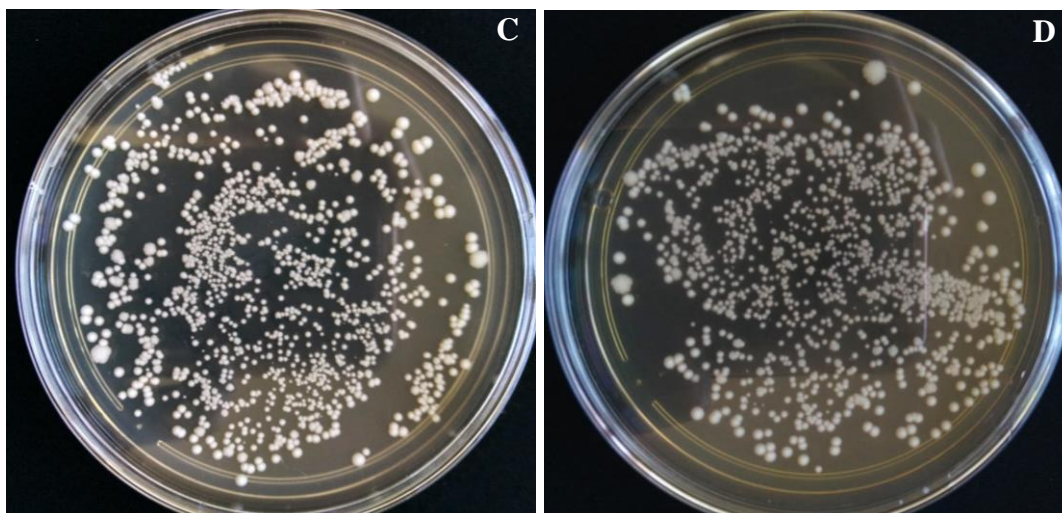
### 5.1. Isolamentos dos Micro-organismos Contaminantes

Durante o período da coleta das amostras, observou-se que um dos principais problemas na usina foi queda na eficiência fermentativa e a alta produção de biomassa nas últimas safras. Atualmente a usina inicia o processo fermentativo com as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 em proporções iguais, além disso, na safra de 2019 a usina vem reutilizando o fermento, o qual passa pelo tratamento com ácido sulfúrico. As amostras foram coletadas de pontos estratégicos da planta de produção de etanol, dentre eles: o caldo bruto, caldo decantado, mosto, mel final, fermento do pé-de-cuba e vinho fermentado. Estes pontos foram escolhidos por serem importantes para avaliação do grau de contaminação do processo, bem como pela facilidade de coleta das amostras.

Na Figura 5 são mostradas algumas das placas com as colônias contaminantes encontradas no caldo bruto (Figura 5A), mosto (Figura 5B), fermento do pé-de-cuba (Figura 5C) e vinho fermentado (Figura 5D). Durante o isolamento foi observado em quase sua totalidade um número significativo de microrganismos selvagens.

**Figura 5** - Contaminação encontrada no processo de produção de etanol de uma usina do Estado de Goiás. Sendo, (A) é a amostra do caldo bruto, (B) mosto, (C) fermento do pé-de-cuba e (D) vinho fermentado.





Fonte: O autor (2019)

No caldo bruto, no mosto e no mel final observou-se colônias bem distintas morfológicamente entre si, podendo ser um indicativo de contaminação por bactérias e leveduras selvagens. De acordo com Ceballos-Schiavone (2009), a contaminação por bactérias na fermentação impacta diretamente na produtividade e no rendimento fermentativo, pois a sacarose pode ser utilizada para geração de ácidos ao invés da geração do etanol pelas leveduras. Além disso, altas concentrações de ácidos podem levar à intoxicação das leveduras. Na Tabela 7 estão as contagens em placa de unidade formadora de colônias por mililitros de amostra (UFC.mL<sup>-1</sup>) em cada ponto que foi coletado na usina.

**Tabela 7** - Unidades formadoras de colônia encontradas nas diferentes etapas do processo produtivo na usina de etanol.

Ponto Coletados	Contagem Padrão em Placa (UFC.mL <sup>-1</sup> )
Caldo bruto	$1,3 \times 10^6$
Caldo decantado	$< 10^2$ (Est.)
Mel final	$2,0 \times 10^5$
Mosto	$4,1 \times 10^5$
Fermento do pé-de-cuba	$1,9 \times 10^7$
Vinho fermentado	$1,2 \times 10^7$

O caldo bruto teve um nível de contaminação de  $1,3 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Na literatura é comum encontrar pesquisas com níveis de contaminação por bactérias, como é o caso de Lucena *et al.* (2010), que encontrou valores de contaminação de bactérias lácteas entre  $7,4 \times$

$10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $6,0 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> no caldo bruto de cana-de-açúcar, valores bem mais altos que a contaminação total encontrada no caldo bruto dessa pesquisa.

Para Silva (2016), o nível de contaminação aceitável para o mosto e mel final deve ser  $<10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Para Teleken (2017) a contaminação aceitável do mosto deve ser  $<10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Portanto, no presente estudo verificou-se alto nível de contaminação nesses dois pontos ( $4,1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $2,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para o mosto e o mel final, respectivamente). Um elevado nível de contaminação no mel e no mosto pode levar a degradação da sacarose e conseqüentemente a queda na eficiência fermentativa, além de outras inconveniências como dificuldade de centrifugação e aumento de ácido sulfúrico para o tratamento do fermento (CHERUBIN, 2003).

O caldo decantado apresentou baixo nível de contaminação, ficando de acordo com as especificações de Teleken (2014), que diz que o ideal é uma contaminação inferior a  $10^2$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Esses resultados possivelmente são conseqüências do tratamento térmico a 115 °C que a usina efetua na etapa anterior à decantação. Segundo os autores Lopes, Gabriel e Borges (2011), o tratamento no caldo de cana-de-açúcar por meio de trocadores de calor é aplicado para elevar a temperatura e conseqüentemente reduzir a carga microbiana. Dessa maneira, os micro-organismos encontrados em etapas posteriores, como por exemplo o mosto, podem ter sido inseridos no processo por outros pontos de contaminação além da lavoura, tal como uma sanitização industrial não efetiva.

Para o fermentado do pé de cuba e o vinho fermentado, a contagem padrão em placa (Tabela 7) implica no somatório de colônias de leveduras com aspecto característico de linhagens fermentadoras (colônias brilhantes, lisas e bordas regulares) e colônias de leveduras selvagens cujas principais características observadas foram o aspecto rugoso e bordas irregulares.

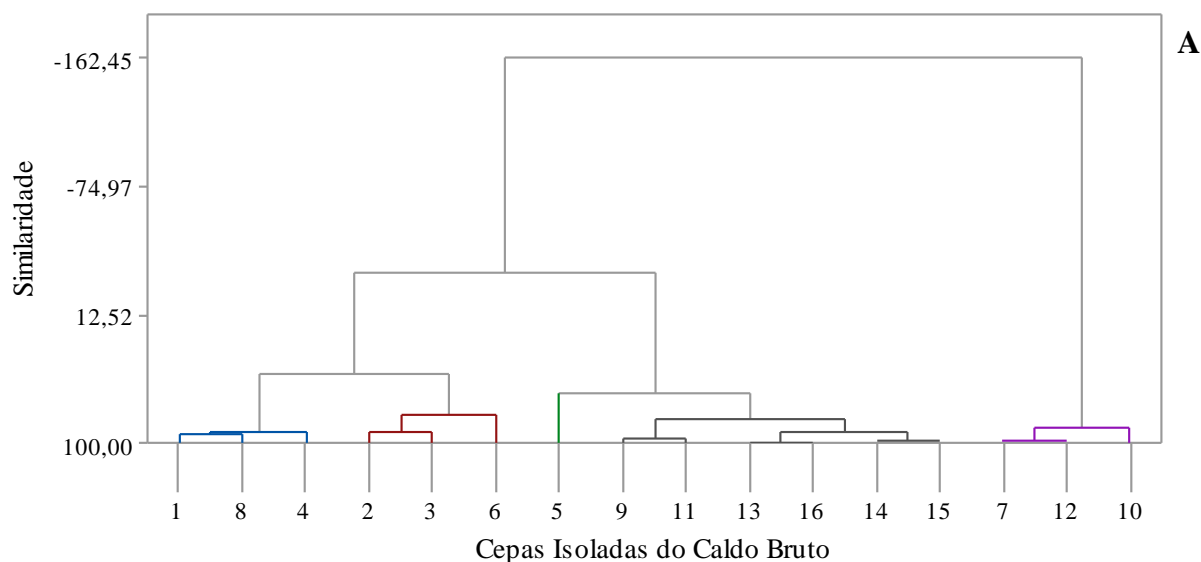
O nível de levedura com aspectos liso no fermento do pé de cuba foi de 79,8 % e com aspecto rugoso foi de 20,2 %. Enquanto o nível de levedura com aspecto liso no vinho fermentado foi de apenas 22,7 % e rugoso predominou em 77,4 % das colônias, esse resultado está acima daqueles encontrados por Viana (2017), que estudou leveduras isoladas no vinho fermentado e a predominância de colônias com aspecto rugoso foi de 64 %. Já na pesquisa de Lopes *et al.* (2015), durante oito safras consecutivas foram analisadas 384 linhagens contaminantes de leveduras e observou-se que 91 % das linhagens eram floculantes, espumantes ou de baixo desempenho fermentativo.

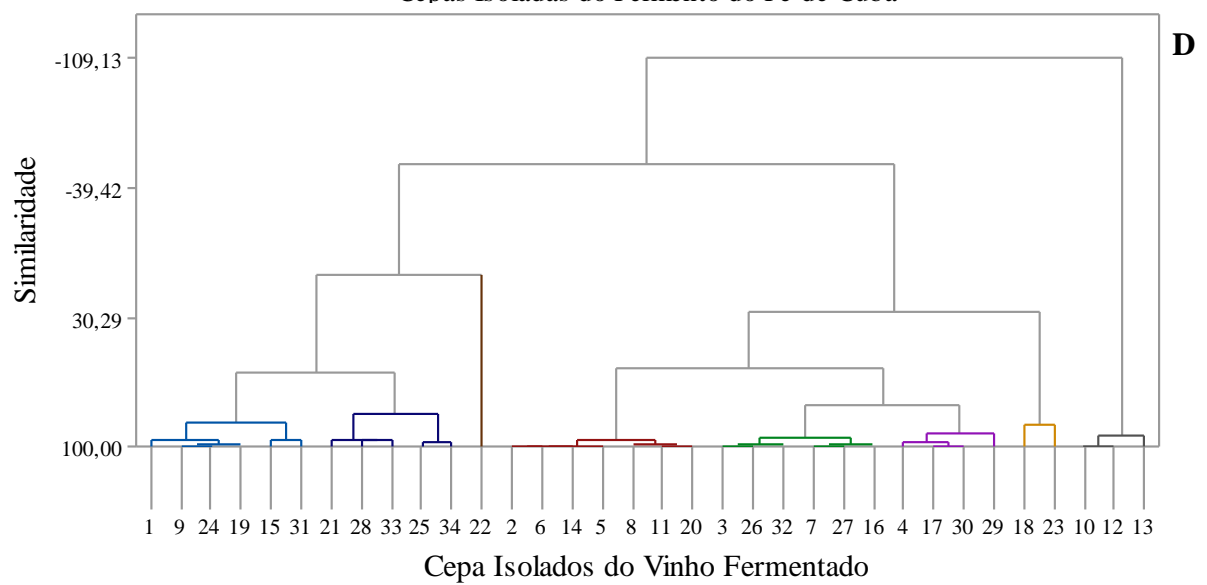
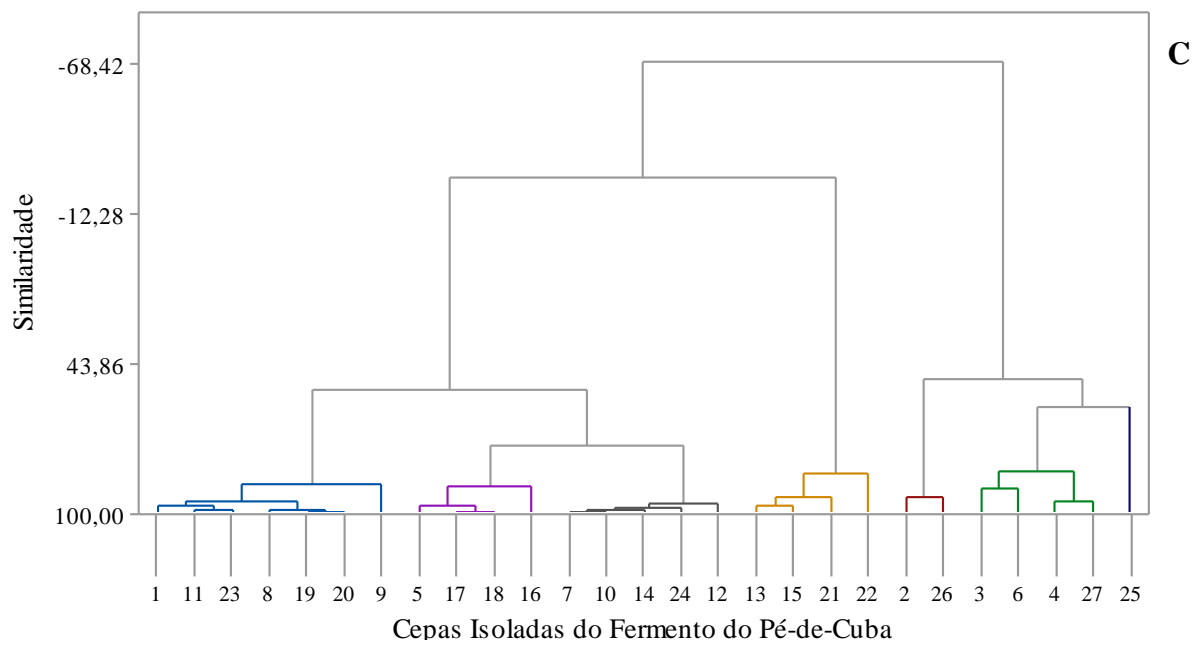
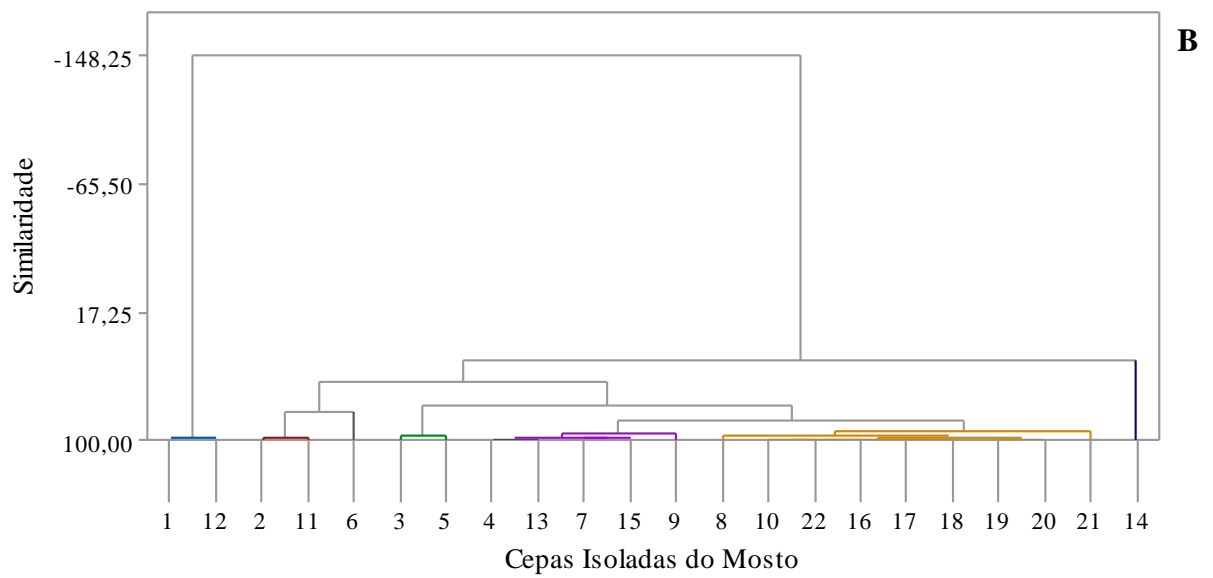
Segundo Andrietta *et al.* (2007), as leveduras habitantes naturais do caldo de cana-de-açúcar apresentam maior potencial para dominarem as dornas de produção de etanol. O caldo proveniente da cana-de-açúcar sadia carrega níveis de fungos de  $10^3$  a  $10^4$  UFC por grama de planta. Portanto, a presença de leveduras selvagens acaba sendo natural, sendo o recurso mais recorrente da usina, para que essas linhagens não dominem as dornas, é a seleção de linhagens de leveduras com bom desempenho fermentativo e maior persistência no processo com reciclo de biomassa.

## 5.2. Desempenho Fermentativo dos Isolados

Os resultados das fermentações com as culturas contaminantes dos seis pontos do processo mostram uma grande diversidade entre o consumo de açúcares e produção dos metabólitos. Foram analisadas 109 colônias isoladas e agrupadas com similaridade de no mínimo 80 %. Os resultados podem ser vistos na Figura 6.

**Figura 6** - Dendrograma de Cluster dos agrupamentos referentes aos micro-organismos isolados do caldo bruto (A), mosto (B), fermento de pé de cuba (C) e vinho fermentado (D).





Os resultados das médias e desvios padrões em termos de concentração celular, consumo de açúcar e produção de etanol, glicerol e ácido acético dos grupos formados pelos dendrogramas de Cluster (Figura 6) estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Resultados das médias de concentração celular, consumo de açúcares e formação de metabolitos dos grupos de micro-organismos isolados do caldo bruto, mosto, mel final, fermento do pé-de-cuba e vinho fermentado.

Amostra	Cód. do Grupo	Nº de Indivíduos no Grupo	Conc. Celular (g.L <sup>-1</sup> )	Consumo de Açúcares (g.L <sup>-1</sup> )	Conc. Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Conc. Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	Conc. Á. Acético (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Caldo Bruto (A)</b>	1A	3	3,85 ± 0,80	97,11 ± 8,17	31,36 ± 3,13	1,39 ± 0,11	0,97 ± 0,52
	2A	3	5,09 ± 1,61	139,75 ± 5,97	35,28 ± 4,77	1,29 ± 0,42	1,21 ± 0,45
	3A	1	5,24 ± 0,04	111,62 ± 0,17	29,16 ± 1,11	4,78 ± 0,11	0,65 ± 0,02
	4A	3	1,95 ± 0,29	77,45 ± 15,88	18,81 ± 2,68	0,45 ± 0,23	2,30 ± 0,76
	5A	6	8,25 ± 0,78	111,56 ± 8,95	27,41 ± 2,44	2,47 ± 0,68	0,24 ± 0,17
<b>Mosto (B)</b>	1B	2	1,72 ± 0,47	89,36 ± 4,30	0,58 ± 0,89	0,11 ± 0,23	39,54 ± 2,90
	2B	2	9,16 ± 0,95	110,93 ± 2,22	19,62 ± 3,91	6,31 ± 0,61	0,40 ± 0,33
	3B	2	9,98 ± 1,29	108,74 ± 3,01	38,93 ± 4,36	3,90 ± 0,32	3,70 ± 1,95
	4B	5	6,78 ± 0,52	114,09 ± 4,34	25,69 ± 4,24	4,25 ± 0,50	2,96 ± 2,45
	5B	1	6,19 ± 0,69	112,83 ± 2,90	5,38 ± 1,27	3,99 ± 0,37	13,74 ± 5,72
	6B	9	6,48 ± 0,65	113,19 ± 3,07	36,87 ± 3,01	3,87 ± 0,67	0,82 ± 0,44
	7B	1	7,53 ± 0,12	81,71 ± 6,32	28,95 ± 1,11	1,33 ± 0,05	1,57 ± 0,07
<b>Mel Final (C)</b>	1C	10	0,01 ± 0,01	52,17 ± 5,50	0,60 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Fermento Pé-de-Cuba (D)</b>	1D	7	2,61 ± 0,12	114,62 ± 8,21	53,37 ± 3,19	4,21 ± 0,26	1,16 ± 0,21
	2D	2	5,80 ± 0,83	121,91 ± 13,35	44,90 ± 3,23	3,38 ± 0,28	0,34 ± 0,10
	3D	4	4,44 ± 0,69	120,49 ± 13,73	47,63 ± 3,82	4,36 ± 0,59	0,64 ± 0,34
	4D	4	4,14 ± 0,32	122,33 ± 12,87	52,78 ± 3,50	3,74 ± 0,41	1,15 ± 0,13
	5D	5	4,54 ± 0,22	124,76 ± 13,93	51,68 ± 4,15	4,47 ± 0,16	1,38 ± 0,19
	6D	4	4,70 ± 0,89	115,63 ± 10,88	54,33 ± 4,73	3,53 ± 0,30	1,08 ± 0,29
	7D	1	5,34 ± 0,24	111,59 ± 1,18	35,80 ± 5,50	5,13 ± 0,18	0,27 ± 0,01
<b>Vinho Fermentado (E)</b>	1E	6	6,46 ± 0,74	111,39 ± 1,98	44,97 ± 4,68	4,47 ± 0,72	0,27 ± 0,05
	2E	7	2,94 ± 0,20	113,33 ± 0,98	53,16 ± 3,90	4,27 ± 0,17	0,44 ± 0,03
	3E	6	5,19 ± 0,37	112,77 ± 1,17	50,05 ± 4,36	4,49 ± 0,18	0,39 ± 0,04
	4E	4	6,57 ± 0,19	113,65 ± 1,06	52,40 ± 4,08	3,11 ± 0,14	0,45 ± 0,15
	5E	3	9,11 ± 0,48	141,95 ± 0,12	32,28 ± 3,31	5,14 ± 0,85	0,27 ± 0,03
	6E	2	6,48 ± 0,48	135,29 ± 14,92	49,71 ± 3,22	3,59 ± 0,24	0,51 ± 0,18
	7E	5	3,96 ± 0,90	110,29 ± 4,12	36,92 ± 5,07	5,10 ± 1,00	0,29 ± 0,12
	8E	1	6,75 ± 1,14	99,38 ± 11,86	38,30 ± 4,78	9,37 ± 4,09	0,63 ± 0,14
<b>Total de Indivíduos</b>		109					

No caldo bruto foram identificados 5 grupos diferentes com base nas respostas de fermentação. Todos os grupos tiveram baixa produção de etanol, entre 18,81 g.L<sup>-1</sup> e 35,28 g.L<sup>-1</sup>, que representa eficiência prática entre 45,43 % a 60,41 %, valores bem abaixo dos encontrados na literatura quando utilizadas as cepas industriais, que estão em torno de 85 % a 96 % de eficiência (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Em relação a produção de biomassa, glicerol, ácido acético e consumo de açúcares, observaram-se grupos bem variados. Dos isolados do caldo bruto, o grupo 3A teve a maior produção de glicerol (4,78 g.L<sup>-1</sup>) e o grupo 4A a maior produção de ácido acético (2,30 g.L<sup>-1</sup>), dessa forma a contaminação por essas culturas isoladas do caldo bruto podem impactar de forma negativa, caso esses grupos dominem as dornas de fermentação.

No mosto foi possível identificar 7 grupos de micro-organismos. Os grupos 3B e 6B tiveram as maiores produções de etanol, sendo de 38,93 g.L<sup>-1</sup> e 36,87 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto o grupo 6B teve produção de ácido acético (0,82 g.L<sup>-1</sup>) e concentração celular (6,48 g.L<sup>-1</sup>) mais baixo que o grupo 3B (3,70 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético e 9,98 g.L<sup>-1</sup> de biomassa celular). Os grupos 1B e 5B do mosto tiveram produções acentuada de ácido acético, sendo respectivamente de 39,54 g.L<sup>-1</sup> e 13,74 g.L<sup>-1</sup>, isso pode representar uma contaminação por bactérias acéticas. Segundo Rizzon (2006), as bactérias acéticas podem resistir à elevada concentração de álcool e de ácido acético e com pouca exigência nutritiva, elevando a velocidade de transformação do etanol em ácido acético.

Os grupos 2B e 3B tiveram alta produção de biomassa, porém o grupo 2B produziu menos etanol e mais glicerol que o grupo 3B. No geral, os grupos de micro-organismos isolados do mosto teriam um efeito negativo na produtividade e na eficiência fermentativa com o altos níveis de contaminação por essas cepas, devido à alta produção de ácido acético e o alto consumo de açúcares observados nos grupos.

No mel final foram analisadas 10 cepas isoladas pertencentes a um único grupo (1C) de acordo com a análise de Cluster. Os resultados fermentativos desse grupo não apresentaram bom desempenho em mosto sintético de cana-de-açúcar. Foi possível notar que a concentração de biomassa celular diminuiu no final de 72 horas e o consumo médio de substrato foi de apenas 52,17 g.L<sup>-1</sup>. Com isso, pôde ser observado que as culturas encontradas no mel final não causariam tanto impacto se contaminassem as fermentações da usina. Esta afirmação pode ser feita devido as condições no mel final serem muito diferentes do mosto sintético, em geral, os sólidos solúveis do mosto estão entre 18 °Brix e 20 °Brix enquanto no mel final os valores encontrados estão entre 75 °Brix e 82 °Brix. Dessa forma, o mel final

possui uma concentração de sólidos bastante elevada, incluindo a presença de açúcares e sais em grandes quantidades como potássio, cálcio e magnésio, elevando assim a pressão osmótica do meio (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; BASSOS, 2011).

No fermento do pé-de-cuba foram identificados 7 grupos, já no vinho fermentado foram identificados 8 grupos. Os grupos desses dois pontos do processo são compostos pelas linhagens de leveduras industriais utilizadas para iniciar o processo fermentativo da usina. Contudo, conforme já observado nos isolados nas placas de Petri, os grupos com baixa produção de etanol podem estar correlacionados com a contaminação das leveduras selvagens.

Na amostra do vinho fermentado, as leveduras selvagens representaram cerca de 77,4 % dos indivíduos presentes. Uma das características observadas nessas leveduras selvagens foi a capacidade de floculação observada visualmente nas fermentações. Algumas linhagens de leveduras podem apresentar na composição genômica a proteínas conhecidas como floculinas, que permitem que essas cresçam de forma floculada. A floculação causada por microrganismos contaminantes naturais da fermentação industrial pode levar a queda no rendimento e produtividade do etanol, assim a presença desse tipo de levedura é indesejada nas destilarias, podendo comprometer o desempenho das linhagens industriais. (ANDRIETTA *et al.*, 2007; LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001). Tendo em conta essa observação e ao alto grau de contaminação nessa amostra do processo, optou-se em utilizar uma das colônias isoladas do vinho fermentado com característica floculante (na qual recebeu a nomenclatura LFS) para avaliar a competência das linhagens BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 em cultura mista.

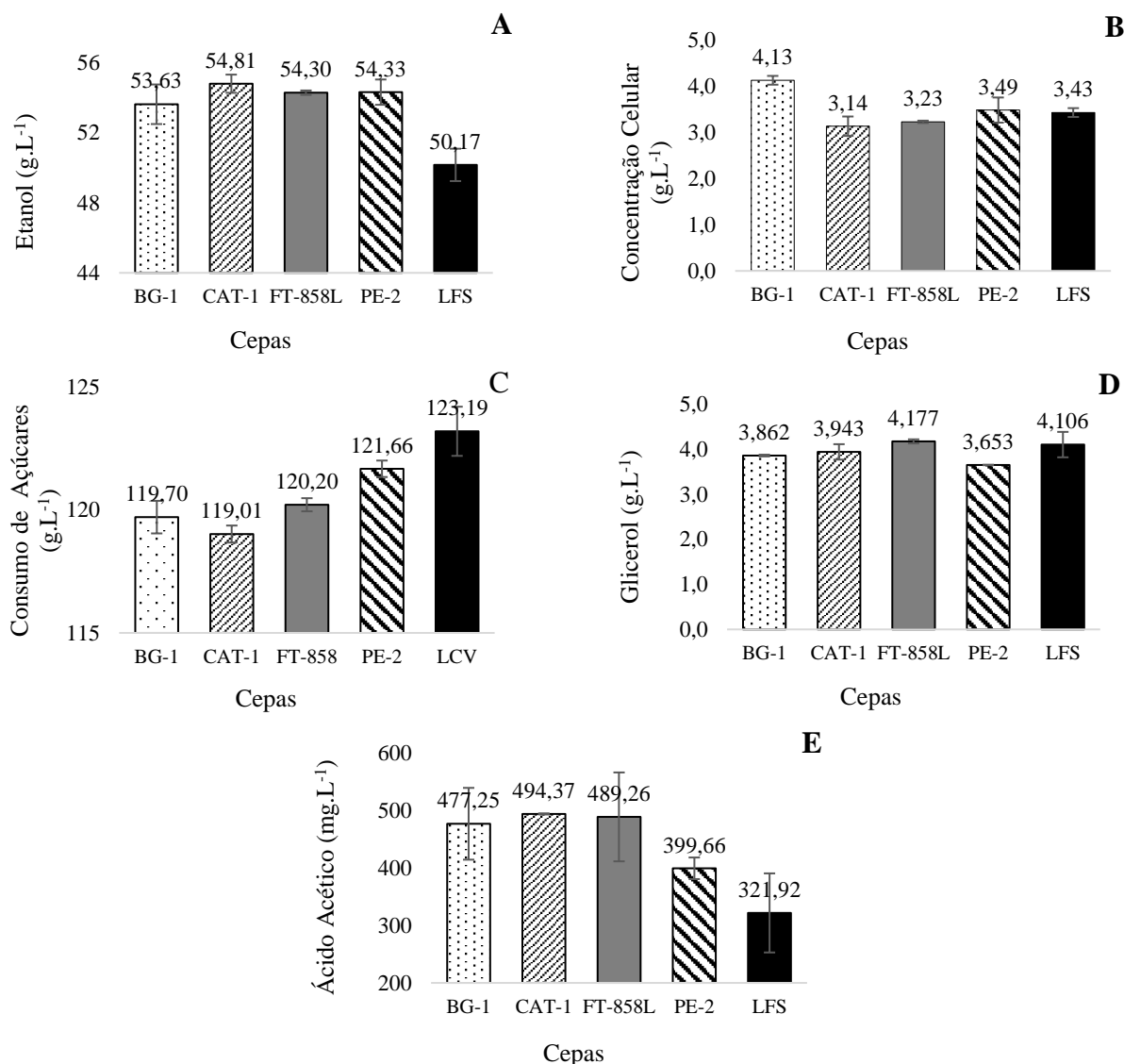
Dessa maneira, a etapa seguinte se refere a comparação do desempenho fermentativo entre LFS com linhagens industriais utilizadas pela usina (BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2). Na etapa seguinte também se buscou observar as possíveis interações entre a baixa eficiência fermentativa e alta produção de biomassa observada na usina, com o intuito de esclarecer um dos maiores problemas observados.

### **5.3. Desempenho Fermentativo das Linhagens Industriais e LFS**

Para a avaliação do desempenho dos micro-organismos em estudo, foram feitas comparações das características fermentativas das linhagens BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e

LFS. Os resultados de concentração celular, etanol, ácido acético, glicerol e consumo de açúcares podem ser visualizados na Figura 7 e na Tabela 9.

**Figura 7** - Resultados de produção de etanol (A), concentração celular (B), consumo de açúcares (C), produção de glicerol (D) e ácido acético (E) das leveduras BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e LFS após 72 horas de fermentação.



A Figura 7A mostra as médias das concentrações de etanol produzidas pelas leveduras. A cepa selvagem LFS obteve uma produção de  $50,17 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol, sendo a menor média em relação as cepas BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, que foram  $53,63 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $54,81 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $54,30 \text{ g.L}^{-1}$  e  $54,33 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados de produção de etanol da LFS apresentaram diminuição significativa quando comparadas com as leveduras

industriais ( $p < 0,05$ ). Entre as linhagens industriais (BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2) não se observou diferenças significativas entre as médias de produção de etanol.

De acordo com a Figura 7B as linhagens BG-1 e PE-2 obtiveram os maiores valores de concentração celular que a CAT-1 e FT-858L. Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), cerca de 5 % do substrato disponível são utilizados pelas células de leveduras para produção de metabólitos secundários e biomassa. O parâmetro que relaciona a produção de biomassa com o consumo de substrato é o fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{x/s}$ ), e pode ser observado na Tabela 9.

**Tabela 9** - Resultados fermentativos de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e concentração de glicerol das cepas BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e LFS após 72 horas de fermentação.

Cepa	BG-1	CAT-1	FT-858L	PE-2	LFS
<b>Etanol</b>					
Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$53,63 \pm 1,13^a$	$54,81 \pm 0,52^a$	$54,30 \pm 0,12^a$	$54,33 \pm 0,72^a$	$50,17 \pm 0,92^b$
$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$0,448 \pm 0,012^a$	$0,461 \pm 0,003^a$	$0,452 \pm 0,002^a$	$0,447 \pm 0,007^a$	$0,407 \pm 0,004^b$
$\emptyset$ ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$0,745 \pm 0,016^a$	$0,761 \pm 0,007^a$	$0,754 \pm 0,002^a$	$0,755 \pm 0,010^a$	$0,697 \pm 0,013^b$
$\eta$ (%)	$83,85 \pm 2,23^a$	$86,17 \pm 0,57^a$	$84,53 \pm 0,38^a$	$83,56 \pm 1,34^a$	$76,21 \pm 0,79^b$
<b>Biomassa</b>					
Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$4,13 \pm 0,01^a$	$4,16 \pm 0,28^a$	$3,23 \pm 0,03^b$	$3,49 \pm 0,27^{ab}$	$3,43 \pm 0,10^{ab}$
$Y_{X/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$0,034 \pm 0,001^a$	$0,034 \pm 0,002^a$	$0,026 \pm 0,000^b$	$0,028 \pm 0,002^b$	$0,023 \pm 0,001^b$
<b>Consumo Açúcares</b>					
Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$119,7 \pm 0,66^{ab}$	$119,01 \pm 0,35^a$	$120,2 \pm 0,27^{ab}$	$121,66 \pm 0,33^{cb}$	$123,19 \pm 1,00^c$
<b>Glicerol</b>					
Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$3,862 \pm 0,019^a$	$3,943 \pm 1,171^a$	$4,177 \pm 0,045^a$	$3,653 \pm 0,005^a$	$4,106 \pm 0,252^a$
<b>Ácido Acético</b>					
Final ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$477,25 \pm 62,56^a$	$494,37 \pm 0,96^a$	$489,26 \pm 77,45^a$	$399,66 \pm 18,81^a$	$321,92 \pm 68,90^a$

Valores acompanhados da mesma letra na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à nível de 5 % de significância.

As cepas BG-1 e CAT-1 apresentaram a mesma média de  $Y_{x/s}$  ( $0,034 \text{ g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$ ), valores próximos aos encontrados por Toniato (2013), de  $0,04 \text{ g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  para BG-1 e CAT-1 na fermentação em caldo de cana. Para linhagem selvagem LFS foi observado fator de conversão de substrato em célula de  $0,023 \text{ g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Na literatura, os valores de  $Y_{x/s}$  para microrganismos produtores de etanol apresenta uma faixa ampla que pode variar de  $0,03 \text{ g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  a  $0,28 \text{ g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  (STROPPA *et al.*, 2009). Na pesquisa de STROPPA *et al.* (2009) foram avaliados o desempenho fermentativo de leveduras selvagens isolados de

alambiques e os valores encontrados ficaram entre 0,179  $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  e 0,185  $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Já Alves (1996), que avaliou oito linhagens isolada de destilaria de álcool, obteve valores do fator de conversão de substrato em células entre 0,087  $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  e 0,099  $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$ , utilizando meio a base de melaço de cana-de-açúcar. Oliveira *et al.* (2004) obtiveram valores de 0,039  $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  a 0,040  $\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$  para dois isolados de um alambique em Minas Gerais, utilizando meio sintético com 150  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glicose.

O fator de conversão de substrato em célula para FT-858L, PE-2 e LFS, não apresentaram diferenças significativa ao nível de 5 % (teste Tukey). Na pesquisa de Ribeiro e Horii (1999) foi observado que uma cepa de levedura floculante utilizou menos substrato para a produção celular quando comparado a linhagem comercial IZ – 987, ou seja, a levedura floculante estudada teve o maior fator de conversão de substrato em célula que a levedura comercial.

Um metabólito importante formado durante o processo fermentativo é o glicerol, sua formação está relacionada à manutenção do equilíbrio redox celular, no qual é alterado na produção NADH da síntese de biomassa, na presença de sulfito e em elevada concentrações de açúcares ou de sais no mosto. (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001; GUTIERREZ, 1991; SANTOS; SOUZA, 2011). Conforme a Figura 7D, observou-se que não houve grandes variações na produção de glicerol entres as cepas estudadas. A Tabela 9 mostra que as cepas não apresentaram diferenças significativas na produção de glicerol a nível de 5 % de significância (teste Tukey).

Além do glicerol, outro subproduto quantificado foi o ácido acético. Foi observado valores entre 321,92  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  e 494,37  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , porém as médias não tiveram diferenças significativas entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. A conversão do acetaldeído em ácido acético provoca alteração no equilíbrio redox celular, que é solucionado pela produção de glicerol (BERG, VAN DEN; STEENSMA, 1995; PÉTER; ROSA, 2005).

De acordo com a classificação de Andrietta *et al.* (1999), valores de fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) acima de 0,45  $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$  é considerado alto nível de produção de etanol, entre 0,44 e 0,41 nível médio e abaixo de 0,41 baixo nível de conversão. Dessa forma, as cepas industriais estudadas tiveram bom desempenho fermentativo, pois foram obtidos valores entre 0,447  $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$  e 0,461  $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$ , e a cepa isolada LFS teve baixo nível de conversão com 0,407  $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$ . Outro parâmetro de interesse industrial é a produtividade ( $\emptyset$ ), pois os valores expressam a concentração de etanol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) produzida por hora de fermentação. Nesse estudo, apenas a LFS com média de produtividade de 0,697  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

apresentou diferença significativa a nível de 5 % (teste Tukey), entre as linhagens industriais (BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2) não houveram diferenças significativas nas médias, obtendo valores entre 0,745 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 0,761 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

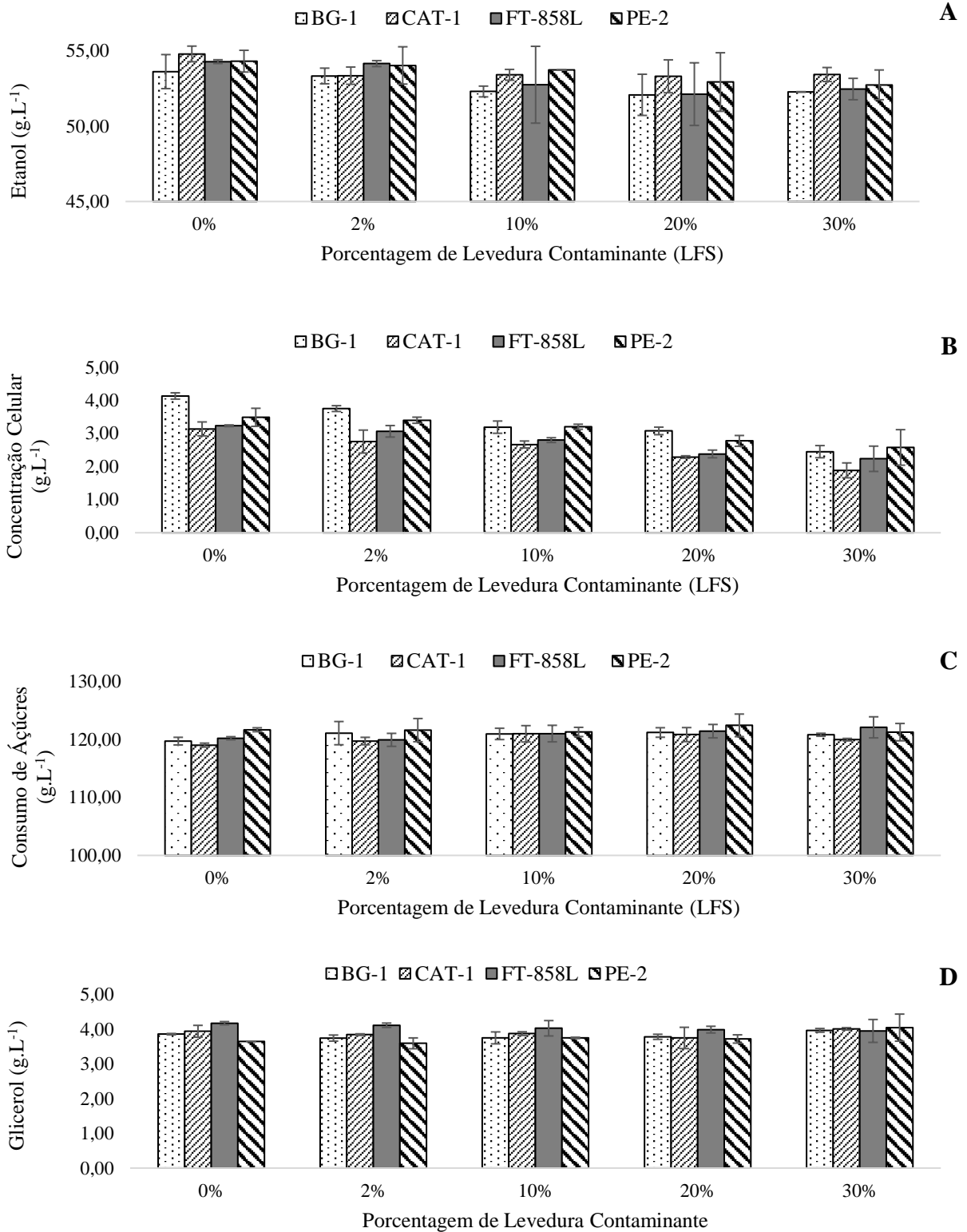
Em relação a eficiência fermentativa ( $\eta$ ), o menor valor encontrado foi 76,21 % para a LFS, já a maior eficiência encontrada foi 86,17 % para CAT-1 nessas condições experimentais. Em estudo parecido de Moreira *et al.* (2013), a cepa de *S. cerevisiae* CAT-1 também teve eficiência mais alta (88,03 %) em comparação com duas cepas de leveduras selvagens (83,66 % e 82,56 %). Já no estudo de Ribeiro e Horii (1999) também foi avaliado o desempenho fermentativo de uma linhagem de levedura floculante em comparação com a cepa IZ – 987, no qual foi observado eficiência fermentativa para levedura floculante de 83,2 % e 89,9 % para IZ – 987.

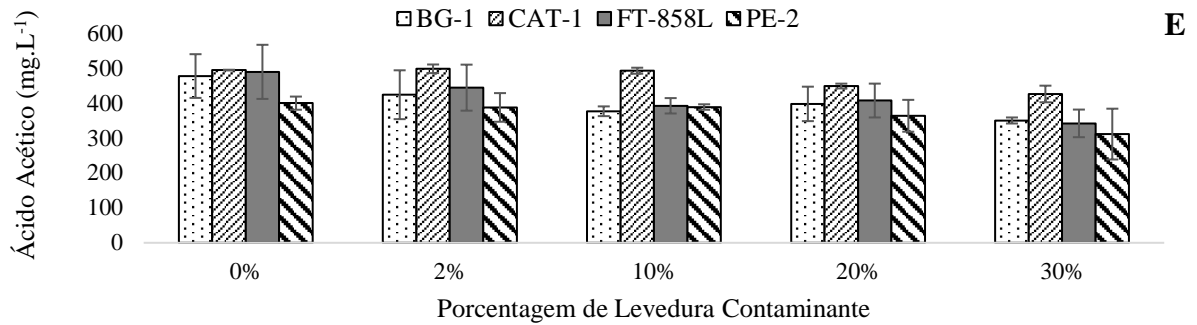
Observou-se que os menores valores de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ) e eficiência fermentativas ( $\eta$ ) estão atribuídos a levedura floculante selvagem (LFS). As médias obtidas por essa levedura apresentaram diferença estatística pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ) em comparação com as cepas BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2. Tais resultados comprovam a superioridade das linhagens industriais utilizadas pelas destilarias. Dessa forma, alto grau de contaminação dessa levedura no processo pode ser responsável pela diminuição da produtividade e eficiência fermentativa.

#### **5.4. Desempenho Fermentativo das Linhagens Industriais em Cultura Mista com Diferentes Porcentagens de LFS**

Com o propósito de estudar as influências da levedura contaminante isolada do vinho fermentado, foi elaborado ensaios com cada uma das cepas industriais em cultura mista com 0 %, 2 %, 10 %, 20 % e 30 % de LFS. Nas Tabelas de 10 a 13 e na Figura 8 são mostrados os resultados das fermentações após 72 horas.

**Figura 8** - Resultados de produção de etanol (A), concentração celular (B), consumo de açúcares (C), formação de glicerol (D) e ácido acético (E) das fermentações realizadas com *S. cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS.





Na Figura 8A mostra que as médias de produção de etanol em cultura mista foram mais baixas em porcentagem de contaminação mais altas. Contudo, apenas para a cepa CAT-1 apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas médias de produção de etanol a partir de 2 % de contaminação pela LFS. Em todas as linhagens industriais não houve diferença significativa em relação à produtividade ( $\emptyset$ ), e com as linhagens PE-2 e FT-858L também não houve diferenças significativas com o fator de conversão de etanol ( $Y_{x/s}$ ) e eficiência ( $\eta$ ) com ao aumento da porcentagem de contaminante. Já nos ensaios com a linhagem BG-1 a queda foi significativa na eficiência e no fator de conversão de etanol nas fermentações a partir de 20 % de LFS e com a linhagem CAT-1 a partir de 2% de LFS.

Conforme Figura 8B, a concentração celular no final da fermentação também apresentou queda com o aumento da porcentagem de contaminação da LFS. Esses dados são confirmados nas Tabelas de 10 a 13 para cada linhagem industrial, onde houve diferença estatística entre as médias ( $p < 0,05$ ). As fermentações com as menores médias de concentração celular estão atribuídas aos ensaios com nível de contaminação inicial de 30 % de LFS no inóculo. Entre as linhagens estudadas, a menor concentração celular encontrada foi 2,23 g.L<sup>-1</sup> quando se utilizou *S. cerevisiae* FT-858L em cultura mista com 30 % LFS. Dessa forma, a presença de LFS mostrou efeito antagônico sobre o crescimento das linhagens industriais. Segundo Ceccato-Antonini e Parazzi (1996) as leveduras contaminantes podem impactar na queda de até 18 % na produção de etanol.

Em relação as médias de consumo de açúcares e concentrações de glicerol, as linhagens estudadas não apresentaram diferenças significativa com o aumento dos níveis de contaminação da LFS ( $p < 0,05$ ). Apesar de Lopes *et al.* (2015) destacar que o comportamento de floculação poder resultar em teores mais elevados de açúcar residual no vinho final da fermentação, o que não foi observado no presente estudo com os níveis de contaminação estudados.

**Tabela 10** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa BG-1 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS.

<b>BG-1</b>					
<b>Contaminante</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>
<b>Etanol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	53,63 ± 1,13 <sup>a</sup>	52,26 ± 1,91 <sup>a</sup>	52,31 ± 1,78 <sup>a</sup>	52,09 ± 1,37 <sup>a</sup>	52,28 ± 0,02 <sup>a</sup>
Yp/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,448 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,444 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,435 ± 0,003 <sup>ab</sup>	0,430 ± 0,015 <sup>b</sup>	0,433 ± 0,001 <sup>b</sup>
$\emptyset$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,745 ± 0,016 <sup>a</sup>	0,726 ± 0,026 <sup>a</sup>	0,712 ± 0,025 <sup>a</sup>	0,712 ± 0,024 <sup>a</sup>	0,726 ± 0,001 <sup>a</sup>
$\eta$ (%)	83,85 ± 2,23 <sup>a</sup>	83,16 ± 0,03 <sup>ab</sup>	81,31 ± 0,60 <sup>ab</sup>	80,43 ± 2,88 <sup>b</sup>	80,93 ± 0,22 <sup>b</sup>
<b>Biomassa</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	4,13 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,09 <sup>b</sup>	3,19 ± 0,18 <sup>c</sup>	3,08 ± 0,11 <sup>c</sup>	2,45 ± 0,18 <sup>d</sup>
Yx/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,036 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,037 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,028 ± 0,000 <sup>c</sup>	0,030 ± 0,002 <sup>c</sup>	0,025 ± 0,001 <sup>d</sup>
<b>Consumo Açúcares</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	90,46 ± 0,66 <sup>a</sup>	91,84 ± 2,00 <sup>a</sup>	91,70 ± 0,97 <sup>a</sup>	91,95 ± 0,82 <sup>a</sup>	91,56 ± 0,25 <sup>a</sup>
<b>Glicerol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	3,86 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,753 ± 0,17 <sup>a</sup>	3,78 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,97 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>Ácido Acético</b>					
Final (mg.L <sup>-1</sup> )	477,3 ± 62,56 <sup>a</sup>	423,8 ± 69,88 <sup>ab</sup>	376,4 ± 13,93 <sup>ab</sup>	397,5 ± 49,26 <sup>ab</sup>	350,1 ± 8,61 <sup>b</sup>

Valores acompanhados da mesma letra na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à nível de 5 % de significância.

**Tabela 11** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa CAT-1 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS.

<b>CAT-1</b>					
<b>Contaminante</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>
<b>Etanol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	54,81 ± 0,52 <sup>a</sup>	53,36 ± 0,57 <sup>b</sup>	53,42 ± 0,86 <sup>b</sup>	53,32 ± 1,09 <sup>b</sup>	53,44 ± 0,46 <sup>b</sup>
Yp/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,461 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,446 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,445 ± 0,001 <sup>bc</sup>	0,44 ± 0,004 <sup>bc</sup>	0,445 ± 0,003 <sup>c</sup>
$\emptyset$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,761 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,741 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,735 ± 0,012 <sup>a</sup>	0,726 ± 0,027 <sup>a</sup>	0,746 ± 0,009 <sup>a</sup>
$\eta$ (%)	86,17 ± 0,57 <sup>a</sup>	83,41 ± 0,57 <sup>b</sup>	83,18 ± 0,21 <sup>bc</sup>	82,26 ± 0,82 <sup>c</sup>	83,29 ± 0,62 <sup>bc</sup>
<b>Biomassa</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	4,16 ± 0,28 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,46 <sup>ab</sup>	3,54 ± 0,14 <sup>ab</sup>	3,04 ± 0,05 <sup>bc</sup>	2,50 ± 0,30 <sup>c</sup>
Yx/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,025 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,022 ± 0,003 <sup>ab</sup>	0,021 ± 0,001 <sup>ab</sup>	0,018 ± 0,000 <sup>bc</sup>	0,015 ± 0,002 <sup>c</sup>
<b>Consumo Açúcares</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	119,01 ± 0,35 <sup>a</sup>	119,71 ± 0,64 <sup>a</sup>	120,96 ± 1,41 <sup>a</sup>	120,83 ± 1,21 <sup>a</sup>	119,96 ± 0,21 <sup>a</sup>
<b>Glicerol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	3,94 ± 0,17 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,88 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,31 <sup>a</sup>	4,01 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>Ácido Acético</b>					
Final (mg.L <sup>-1</sup> )	494,37 ± 0,96 <sup>a</sup>	497,99 ± 12,32 <sup>a</sup>	492,48 ± 8,64 <sup>a</sup>	448,65 ± 6,89 <sup>ab</sup>	425,92 ± 23,77 <sup>b</sup>

Valores acompanhados da mesma letra na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à nível de 5% de significância.

**Tabela 12** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa FT-858L em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS.

<b>FT-858L</b>					
<b>Contaminante</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>
<b>Etanol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	54,30 ± 0,12 <sup>a</sup>	54,17 ± 0,20 <sup>a</sup>	52,76 ± 2,55 <sup>a</sup>	52,14 ± 2,08 <sup>a</sup>	52,47 ± 0,71 <sup>a</sup>
Yp/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,452 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,452 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,436 ± 0,026 <sup>a</sup>	0,430 ± 0,021 <sup>a</sup>	0,434 ± 0,007 <sup>a</sup>
$\emptyset$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,754 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,752 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,733 ± 0,035 <sup>a</sup>	0,724 ± 0,029 <sup>a</sup>	0,729 ± 0,042 <sup>a</sup>
$\eta$ (%)	84,53 ± 0,38 <sup>a</sup>	84,53 ± 0,98 <sup>a</sup>	81,63 ± 4,87 <sup>a</sup>	80,38 ± 3,95 <sup>a</sup>	81,13 ± 1,25 <sup>a</sup>
<b>Biomassa</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	3,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,17 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,07 <sup>ab</sup>	2,38 ± 0,12 <sup>bc</sup>	2,23 ± 0,38 <sup>c</sup>
Yx/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,026 ± 0,000 <sup>a</sup>	0,025 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,022 ± 0,001 <sup>ab</sup>	0,019 ± 0,001 <sup>bc</sup>	0,017 ± 0,003 <sup>c</sup>
<b>Consumo Açúcares</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	120,2 ± 0,27 <sup>a</sup>	119,92 ± 1,12 <sup>a</sup>	121 ± 1,43 <sup>a</sup>	121,42 ± 1,16 <sup>a</sup>	122,08 ± 1,82 <sup>a</sup>
<b>Glicerol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	4,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,12 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,03 ± 0,22 <sup>a</sup>	3,99 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,95 ± 0,33 <sup>a</sup>
<b>Ácido Acético</b>					
Final (mg.L <sup>-1</sup> )	489,26 ± 77,45 <sup>a</sup>	444,02 ± 65,88 <sup>ab</sup>	392,08 ± 22,02 <sup>ab</sup>	407,16 ± 48,42 <sup>ab</sup>	341,74 ± 39,56 <sup>b</sup>

Valores acompanhados da mesma letra na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à nível de 5 % de significância.

**Tabela 13** - Resultados de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e glicerol da cepa PE-2 em cultura mista com diferentes porcentagens de LFS.

<b>PE-2</b>					
<b>Contaminante</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>
<b>Etanol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	54,33 ± 0,72 <sup>a</sup>	54,04 ± 1,24 <sup>a</sup>	53,74 ± 0,00 <sup>a</sup>	52,94 ± 1,95 <sup>a</sup>	52,75 ± 0,99 <sup>a</sup>
Yp/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,447 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,449 ± 0,013 <sup>a</sup>	0,444 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,433 ± 0,026 <sup>a</sup>	0,435 ± 0,013 <sup>a</sup>
$\emptyset$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,755 ± 0,010 <sup>a</sup>	0,732 ± 0,034 <sup>a</sup>	0,748 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,718 ± 0,035 <sup>a</sup>	0,733 ± 0,014 <sup>a</sup>
$\eta$ (%)	83,56 ± 1,34 <sup>a</sup>	83,95 ± 2,38 <sup>a</sup>	83,03 ± 0,71 <sup>a</sup>	81,05 ± 4,79 <sup>a</sup>	81,43 ± 2,50 <sup>a</sup>
<b>Biomassa</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	3,49 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,40 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,08 <sup>ab</sup>	2,77 ± 0,16 <sup>ab</sup>	2,58 ± 0,54 <sup>b</sup>
Yx/s (g.g <sup>-1</sup> )	0,028 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,027 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,026 ± 0,001 <sup>ab</sup>	0,022 ± 0,001 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,005 <sup>b</sup>
<b>Consumo Açúcares</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	121,66 ± 0,33 <sup>a</sup>	121,6 ± 2,00 <sup>a</sup>	121,28 ± 0,79 <sup>a</sup>	122,42 ± 1,95 <sup>a</sup>	121,25 ± 1,49 <sup>a</sup>
<b>Glicerol</b>					
Final (g.L <sup>-1</sup> )	3,65 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,72 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,39 <sup>a</sup>
<b>Ácido Acético</b>					
Final (mg.L <sup>-1</sup> )	399,66 ± 18,81 <sup>a</sup>	387,37 ± 41,00 <sup>a</sup>	388,55 ± 7,83 <sup>a</sup>	363,52 ± 45,60 <sup>a</sup>	311,10 ± 72,74 <sup>a</sup>

Valores acompanhados da mesma letra na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à nível de 5 % de significância.

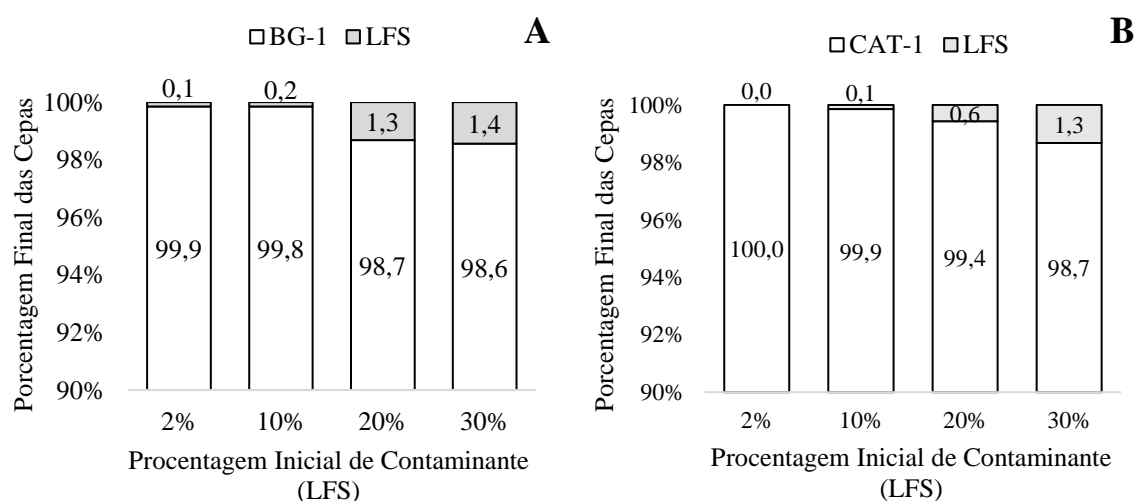
Para a produção de ácido acético, apenas a cepa PE-2 não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Já as cepas BG-1, CAT-1 e FT-858L apresentaram diferenças significativas e os valores de concentração de ácido acético foram menores nas fermentações com 30 % de contaminação de LFS.

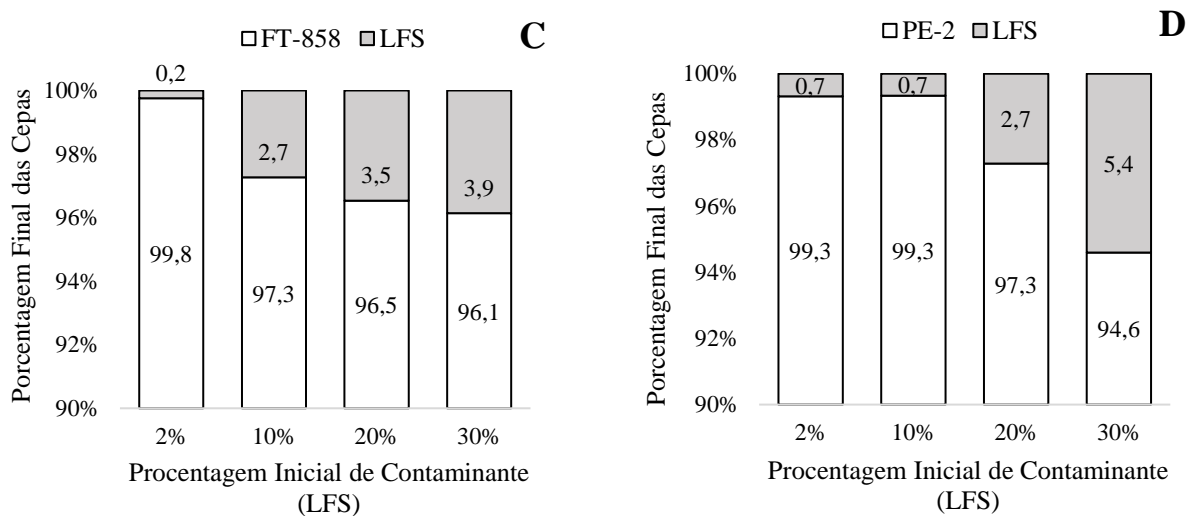
Os resultados de desempenho fermentativo das linhagens com diferentes níveis de contaminação de LFS se mostraram prejudiciais apenas para a BG-1 e a CAT-1, pois os níveis de contaminação interferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) no fator de conversão de etanol e na eficiência fermentativas quando comparadas com as fermentações utilizando culturas puras. Uma vez que não foi observado grandes prejuízos com as demais cepas industriais, a etapa seguinte do trabalho foi obter informações sobre a competência das linhagens industriais, avaliando a porcentagem final de LFS nas fermentações de cultura mista.

### 5.5. Competência das Linhagens Industriais em Cultura Mista com LFS.

O estudo da competência de uma população microbiana busca compreender a dinâmica populacional dentre os microrganismos existentes na cultura, e por meio da Figura 9 foi possível analisar a dominância das linhagens industriais sobre LFS.

**Figura 9** - Resultados de predominância nas fermentações com diferentes níveis de contaminação inicial (2 %, 10 %, 20 % e 30 % de LFS). Sendo a LFS em cultura mista com (A) BG-1, (B) CAT-1, (C) FT-858L e (D) PE-2.

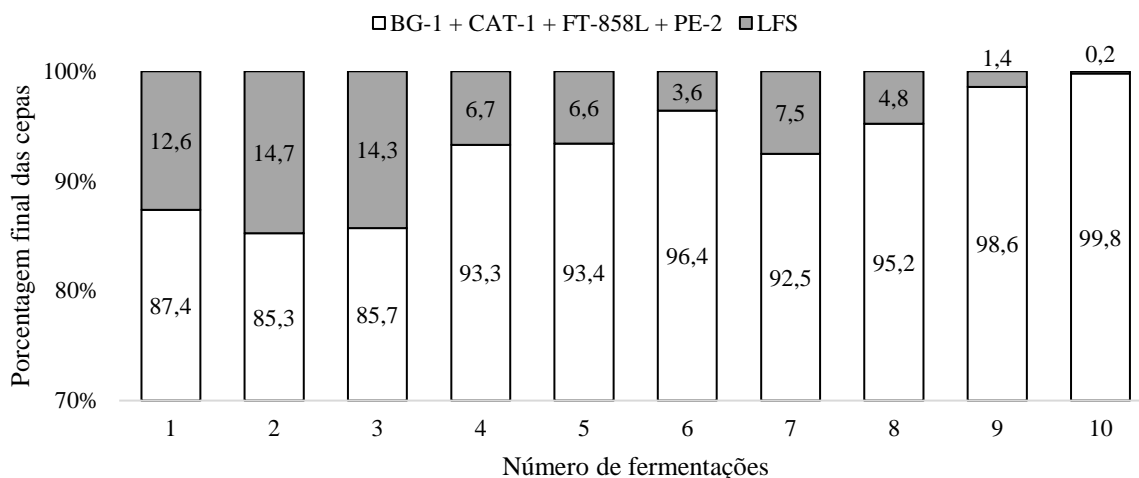




De acordo com a Figura 9, nas fermentações de todas as linhagens industriais estudadas apresentaram reduções da porcentagem final de contaminação pela LFS. Dentre essas linhagens, a cepa com maior dominância sobre a LFS foi da CAT-1, onde não houve crescimento de nenhuma colônia contaminante no final do período de 72 horas de fermentação com contaminação inicial de 2 % de LFS. Nos ensaios com 10 % de contaminação inicial foi possível observar apenas 0,1 % da LFS nas fermentações de cultura mista com CAT-1 e de 0,2 % nas fermentações cultura mista da BG-1. Nas fermentações com nível de contaminação inicial de 20 % e 30 % de LFS, as linhagens BG-1 e CAT-1 também apresentaram melhores resultados de dominância que as linhagens FT-858L e PE-2.

Avaliou-se também a dominância das linhagens BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2 em cultura mista com a LFS e com reutilização dos inóculos ao longo de 10 fermentações consecutivas com porcentagens iniciais de 30 % de LFS, 17,5 % BG-1, 17,5 % CAT-1, 17,5 % FT-858L e 17,5 % PE-2. Na Figura 10 estão os resultados das porcentagens de levedura contaminante no final de cada fermentação.

**Figura 10** - Análise de competência das cepas em cultura mista com porcentagem inicial de células de 30 % LFS, 17,5 % BG-1, 17,5 % CAT-1, 17,5 % FT-858L e 17,5 % PE-2 com reutilização do inóculo ao longo de 10 fermentações.



Notou-se que logo na primeira fermentação a porcentagem de LFS reduziu para 12,6 % e manteve valores próximos na segunda e terceira fermentação (14,7 % e 14,3 %, respectivamente). Na quarta fermentação, o nível de contaminação reduziu para 6,7 %, e a partir desse ponto mantiveram-se abaixo de 10 %, chegando na décima fermentação com nível de contaminação de apenas 0,2 %.

A Figura 10 em comparação com a Figura 9, observou-se que nos ensaios de cultura mista com duas cepas e nível de contaminação de 30 %, após 72 horas de fermentação a maior porcentagem de células da LFS obtida foi de 5,4 % (Figura 8D), e quando realizou-se o ensaio de cultura mista com as cinco cepas (30 % LFS, 17,5 % BG-1, 17,5 % CAT-1, 17,5 % FT-858L e 17,5 % PE-2) a LFS teve redução no número de células para 12,6% com o mesmo período de fermentação. Possivelmente esse resultado de maior porcentagem da LFS da fermentação de cultura mista com todas as cepas foi por meio do aumento da competitividade entre as linhagens.

No entanto, os experimentos confirmaram a superioridade das linhagens fermentadoras comumente utilizadas para a produção etanol, que segundo Basso *et al.* (2008), as cepas PE-2, CAT-1 e BG-1 já mostraram uma capacidade notável de competir com leveduras selvagens, sobrevivendo e dominando durante as fermentações industriais. Os autores Argueso & Pereira (2010) atribuem a permanência da PE-2 no processo à sua complexidade genômica, a qual permite a adaptação desta ao ambiente industrial. Já a linhagem FT-858L, por ser uma linhagem nova, implantada pela empresa Fermentec® no ano

de 2010, há poucas informações, mas mostrou dominância sobre a contaminante como as demais linhagens industriais estudadas (AMORIM, 2011).

Os resultados também mostram que em nenhuma condição a levedura LFS apresentou sinais de sobreposição, o que sugere possivelmente haver outros fatores envolvidos na usina que fazem com que em aproximadamente 5 meses de reutilização das leveduras chegue a um grau de contaminação de aproximadamente 77 % no vinho fermentado.

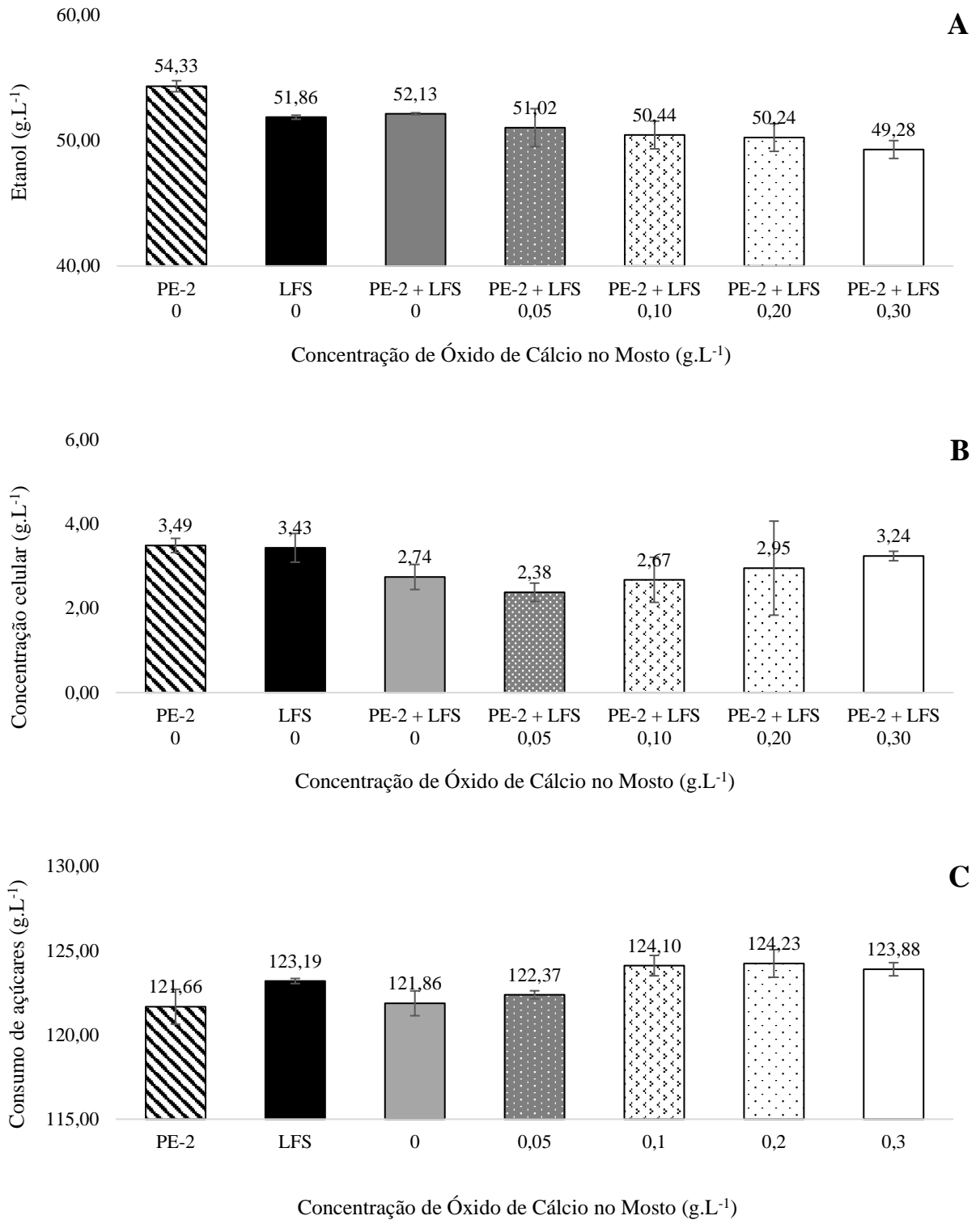
No estudo realizado por Stroppa *et al.* (2009) foram isoladas linhagens de leveduras para serem utilizadas como iniciadoras, e foi observado que de um pequeno número de leveduras isoladas, somente algumas são adaptadas às condições de operação e multiplicação nas dornas. Para Lopes *et al.* (2015), a interação entre linhagens de leveduras e a dinâmica da populações durante as safras nas destilarias podem ser consideradas como uma “ilha”, pois possuem características próprias como a composição de mosto de cana, instalações, processos de fermentação, concentração de etanol no vinho, mudanças de temperatura, tratamento ácido do levedo, entre outros.

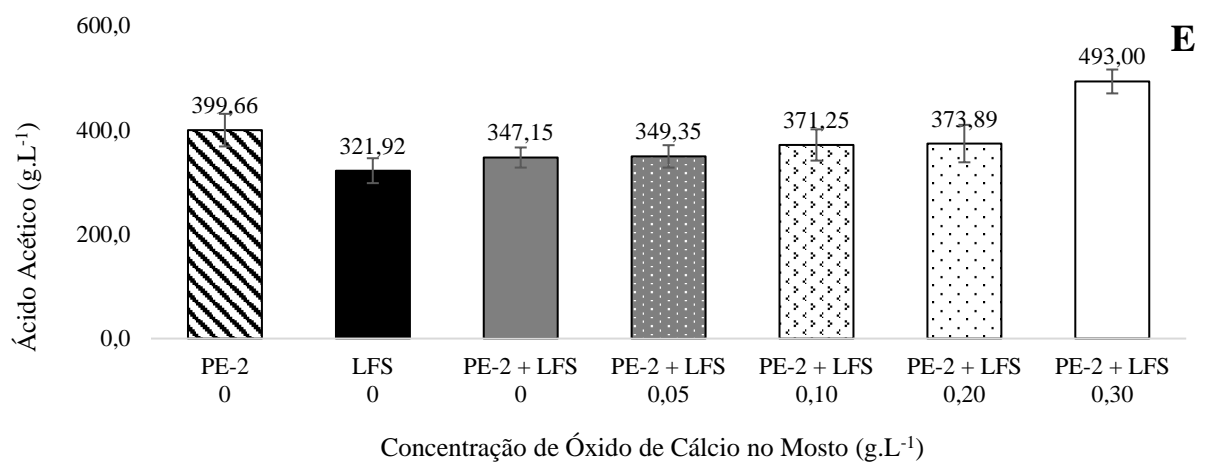
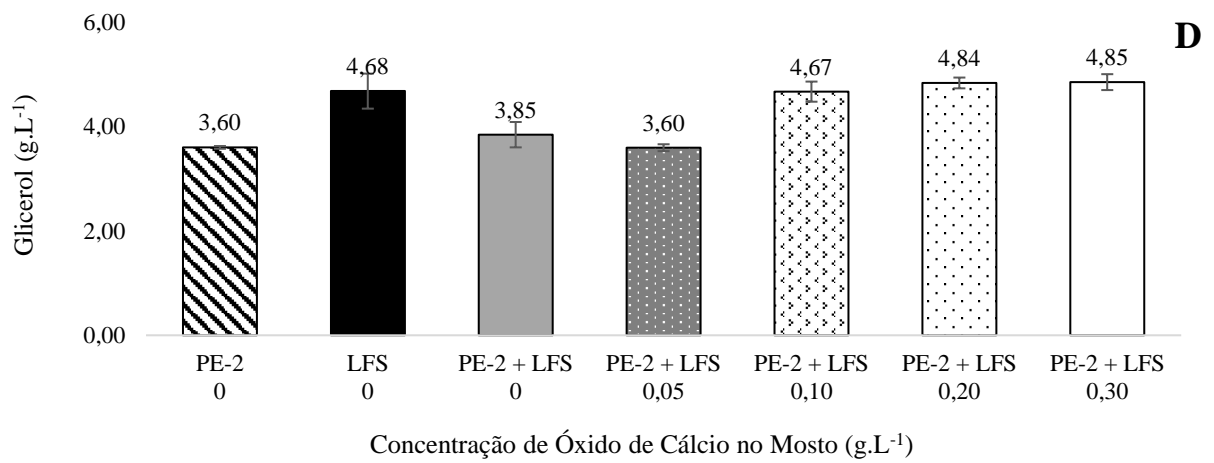
Portanto, o outro fator estudado para compreender o favorecimento a contaminante LFS na usina foi a variação das concentrações de óxido de cálcio no mosto sintético. O tipo de cátion presente no mosto como manganês, magnésio e cálcio pode mediar ou incrementar a floculação, em específico os íons  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de pequenas concentrações favorece a floculação das leveduras (STRATFORD, 1993).

### **5.6. Desempenho fermentativo da Linhagem PE-2 em Cultura Mista com a LFS em Mosto Acrescido de Óxido de Cálcio.**

A linhagem de leveduras PE-2 foi selecionada no Brasil a partir de fermentações alcoólicas com reciclo total da biomassa, e segundo Basso *et al.* (2008) é uma das linhagens mais utilizadas nas usinas de etanol devido sua capacidade fermentativa. Os resultados apresentados na Figura 11 e na Tabela 14 mostram o desempenho fermentativo de cultura pura das cepas PE-2 e LFS em comparação com as duas cepas em cultura mista na proporção de 0,7 para a PE-2 e 0,3 para LFS com diferentes concentrações de óxido de cálcio no mosto sintético.

**Figura 11** - Resultados de concentração celular e formação de metabólitos das levedura PE-2 em cultura mista com a LFS em fermentações com diferentes concentrações de óxido de cálcio após 72 horas de fermentação. Sendo (A) as concentrações de etanol, (B) concentrações celulares, (C) consumo de açúcares, (D) concentração de glicerol e (E) concentração de ácido acético.





**Tabela 14** - Parâmetros fermentativos de concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade ( $\emptyset$ ), eficiência fermentativas ( $\eta$ ), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ), consumo de açúcares, concentração de ácido acético e concentração de glicerol das cepas *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em cultura mista com a LFS em fermentações com diferentes concentrações de óxido de cálcio (CaO).

		Cultura pura		Concentração de CaO no mosto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) em cultura mista com 70% PE-2 e 30% LFS				
		PE-2	LFS	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30
Etanol								
	Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	54,33 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	51,86 $\pm$ 1,16 <sup>ab</sup>	52,13 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	51,02 $\pm$ 0,93 <sup>bc</sup>	50,44 $\pm$ 1,11 <sup>bc</sup>	50,24 $\pm$ 1,10 <sup>bc</sup>	49,28 $\pm$ 0,70 <sup>c</sup>
	$Y_{p/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,447 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,421 $\pm$ 0,001 <sup>bc</sup>	0,428 $\pm$ 0,003 <sup>ab</sup>	0,417 $\pm$ 0,036 <sup>bcd</sup>	0,407 $\pm$ 0,011 <sup>cd</sup>	0,404 $\pm$ 0,008 <sup>cd</sup>	0,398 $\pm$ 0,007 <sup>d</sup>
	$\emptyset$ ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	0,755 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,720 $\pm$ 0,016 <sup>b</sup>	0,724 $\pm$ 0,001 <sup>ab</sup>	0,709 $\pm$ 0,044 <sup>bc</sup>	0,701 $\pm$ 0,028 <sup>bc</sup>	0,698 $\pm$ 0,029 <sup>bc</sup>	0,684 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
	$\eta$ (%)	83,57 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	78,78 $\pm$ 0,25 <sup>bc</sup>	80,05 $\pm$ 0,60 <sup>ab</sup>	78,02 $\pm$ 2,16 <sup>bcd</sup>	76,07 $\pm$ 2,03 <sup>cd</sup>	75,68 $\pm$ 1,56 <sup>cd</sup>	74,45 $\pm$ 1,31 <sup>d</sup>
Biomassa								
	Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	3,49 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	3,43 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	2,74 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	2,38 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	2,95 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	3,24 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
	$Y_{x/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,028 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,027 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,022 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,025 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,021 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,023 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,025 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>
Consumo de Açúcares								
	Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	121,66 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	123,19 $\pm$ 0,15 <sup>abc</sup>	121,86 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	122,37 $\pm$ 0,24 <sup>bc</sup>	124,1 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	124,23 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	123,88 $\pm$ 0,39 <sup>ab</sup>
Glicerol								
	Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	3,60 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	4,68 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	3,85 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	3,60 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	4,67 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	4,84 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4,85 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
Ácido Acético								
	Final ( $\text{g.L}^{-1}$ )	399,7 $\pm$ 44,2 <sup>b</sup>	321,9 $\pm$ 33,8 <sup>c</sup>	347,2 $\pm$ 19,3 <sup>bc</sup>	349,3 $\pm$ 21,5 <sup>bc</sup>	371,3 $\pm$ 30 <sup>bc</sup>	373,9 $\pm$ 35,9 <sup>bc</sup>	493 $\pm$ 22,9 <sup>a</sup>

Valores acompanhados da mesma letra na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à nível de 5 % de significância.

Em relação a produção de etanol da linhagem PE-2, a Figura 11A mostra que o ensaio de cultura pura dessa linhagem sem adição de óxido de cálcio apresentou a média mais alta ( $54,33 \text{ g.L}^{-1}$ ), seguido pelo ensaio com PE-2 em cultura mista sem adição de óxido de cálcio ( $52,13 \text{ g.L}^{-1}$ ). Dessa forma, é importante salientar que os resultados mais baixos de produção de etanol foram encontrados nos ensaios de cultura mista (PE-2 e LFS) adicionados de óxido de cálcio entre  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,30 \text{ g.L}^{-1}$ , e quanto maior a concentração de óxido de cálcio no mosto menor foi a concentração final de etanol.

Contudo, no teste de comparação de média da Tabela 14, a concentração final de etanol com a concentração mais alta de óxido de cálcio no mosto ( $0,30 \text{ g.L}^{-1}$ ) não diferenciou-se estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos ensaios com  $0,20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ . O fator de conversão de substrato em produto, produtividade e eficiência fermentativa também foram menores quando se utilizou óxido de cálcio no mosto nas concentrações entre  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,30 \text{ g.L}^{-1}$  (Tabela 14).

A eficiência fermentativa da linhagem PE-2 é encontrada na literatura em uma faixa que varia entre 88,7 % e 92,0 % (ADRIETTA, 1997; BASSO *et al.*, 2008; CRUZ, 2019). Nas condições desse estudo, a PE-2 teve eficiência de 83,57 % em cultura pura, já na presença de 30 % da contaminante LFS o rendimento caiu para 80,05 %, e com o acréscimo de  $0,30 \text{ g.L}^{-1}$  de óxido de cálcio obteve-se o menor rendimento que foi de 74,45 %. Possivelmente essas condições adversas impostas à linhagem PE-2 corroboram com as informações dos autores Andrietta, Andrietta e Stupiello (2011) que afirma que a PE-2 é uma levedura que tem a capacidade de permanecer, embora nem sempre como dominante, fazendo com que seu rendimento fermentativo possa ser altamente afetado.

A levedura que produz maior quantidade de massa celular ( $Y_x/s$ ) tem maior chance de dominar o processo de fermentação (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011). Contudo, as cepas PE-2 e LFS não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ), assim como os tratamentos com diferentes concentrações de óxido de cálcio também não apresentaram diferença estatística para a concentração de biomassa e o fator de conversão de substrato.

Na Figura 11C mostra que o consumo de açúcares foi mais alto com as concentrações de óxido de cálcio mais elevadas. Tendo em vista a diminuição da produção de etanol nessas condições, esses resultados podem indicar um desvio de substrato para produção de outros metabólitos ao invés do etanol. Desses outros metabólitos, possivelmente um deles seja o glicerol, pois a análise estatística apontou também diferença significativa entre os tratamentos com maiores concentrações de óxido de cálcio e a fermentação pura da PE-2.

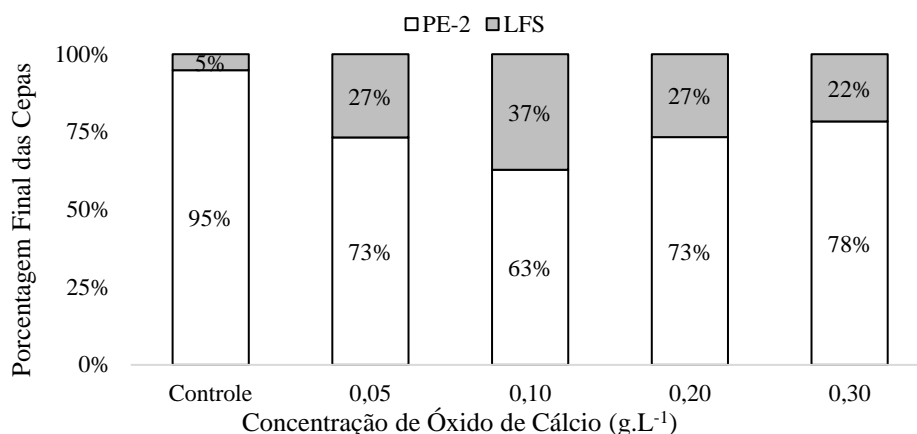
O aumento de produção de glicerol, pode estar associado à formação de sal pelo óxido de cálcio em pH ácido. No estudo de Lima (2019), a concentração elevada de sais no mosto aumentou a produção de glicerol, e na pesquisa de Alves (2000) observou-se que com níveis médios de potássio de 4,0 g.L<sup>-1</sup> houve aumento na formação de glicerol e a redução do rendimento de etanol.

Já na Figura 11E mostra que o ensaio que teve maior concentração de ácido acético foi a PE-2 com contaminação da LFS em mosto com 0,30 g.L<sup>-1</sup> de óxido de cálcio. De acordo com Eglinton *et al.* (2002), o aumento da atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase pode aumentar a produção de ácido acético. Como observado também no trabalho de Tonolli (2017) a alta concentração de glicerol pode ter elevado a produção de ácido acético, com uma ressalva apenas no ensaio com a LFS pura, onde foi observado um comportamento diferente dos demais ensaios onde a alta produção de glicerol não elevou a concentração de ácido acético. Esse comportamento da LFS já tinha sido observado em ensaios anteriores, e por se tratar de uma linhagem selvagem isolada de um processo fermentativo, a baixa produção de ácido acético da LFS pura pode ser justificada pela grande biodiversidade que temos de leveduras selvagens.

### **5.7. Competência da Linhagem PE-2 em Cultura Mista com a LFS.**

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 revelou em um estudo do seu genoma a capacidade de adaptação da levedura a diversas condições dos processos fermentativos, a aplicação dessa linhagem em diversas usinas de etanol é devido a alta tolerância ao etanol, baixa formação de espuma, alta capacidade de implantação, resistência na fermentação (FERMENTEC®, 2020). Na literatura existem diversos estudos da competência e dinâmica da população microbiana com a PE-2 e outras linhagens, mas pouco sabe-se do comportamento dessa linhagem em condições de cultura mista com levedura selvagem flocculante e com a presença de diferentes concentrações de cálcio no mosto. A Figura 12 mostra a porcentagem de linhagem PE-2 no final dos ensaios quando fermentada em cultura mista com 30% do inóculo de LFS e com concentrações entre 0,00 g.L<sup>-1</sup> e 0,30 g.L<sup>-1</sup> de óxido de cálcio no mosto sintético.

**Figura 12** - Resultados de predominância da PE-2 com níveis de contaminação inicial de 30 % de LFS acrescido de óxido de cálcio no mosto (0,00 g.L<sup>-1</sup>, 0,05 g.L<sup>-1</sup>, 0,10 g.L<sup>-1</sup>, 0,20 g.L<sup>-1</sup> e 0,30 g.L<sup>-1</sup>).



De acordo com a Figura 12 a porcentagem da levedura contaminante LFS em mosto sem adição óxido de cálcio reduziu de 30 % para 5 % no final da fermentação, já nas fermentações na presença de óxido de cálcio observou-se que a levedura flocculante LFS teve melhores resistências nas fermentações. Conforme observado por Teixeira *et al.* (1995), os íons Ca<sup>2+</sup> atuam como cofatores de ativação ao induzir a interação entre as paredes celulares no processo de flocculação entre células flocculantes e não flocculantes,

Porém observou-se nesse trabalho que existe uma concentração de íons Ca<sup>2+</sup> ideal para um aumento na concentração de levedura flocculante. As adições de óxido de cálcio no mosto fizeram com que as porcentagens finais de levedura flocculante fosse maiores que os resultados anteriores desse trabalho, com a adição de 0,10 g.L<sup>-1</sup> de óxido de cálcio no mosto obteve-se a maior porcentagem de LFS que foi de 37 %, ou seja, maior velocidade de crescimento que a cepa industrial PE-2.

Essa constatação é importante, pois notou-se a presença de uma faixa de concentração de óxido de cálcio (ao redor de 0,10 g.L<sup>-1</sup>) na qual é possível privilegiar o crescimento da levedura LFS em relação a PE-2, e uma possível sobreposição da cepa industrial ao longo do tempo se realizado a reutilização do fermento.

Esse resultado corrobora com o cenário que foi encontrado na usina, visto que na determinação da concentração de cálcio no mosto industrial foi detectado o teor adicional 0,09 g.L<sup>-1</sup> desse íon, assim os resultados de qualidade do mosto da usina em estudo se aproximam bastante da condição mais crítica que foi avaliada em laboratório. Possivelmente, esse foi um fator determinante para ter favorecido o desenvolvimento da levedura flocculante

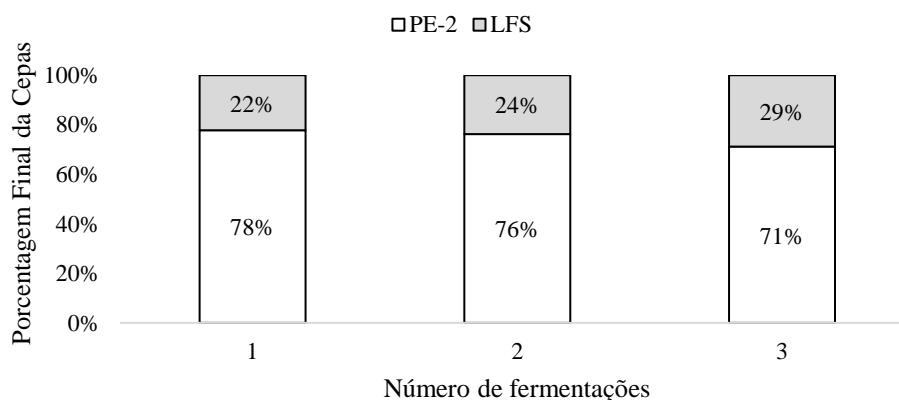
selvagem, com o decorrer das safras, para que chegasse ao nível preocupante de 77,4 % de contaminação.

Já com adição de 0,05 g.L<sup>-1</sup>, 0,20 g.L<sup>-1</sup> e 0,30 g.L<sup>-1</sup> as porcentagens de LFS foram 27 %, 27 % e 22 %, respectivamente. É possível notar como a PE-2 teve sua dominância desfavorecida com a adição de óxido de cálcio no mosto em relação aos ensaios anteriores desse trabalho. Esse efeito inibidor no crescimento de leveduras está ligado à competição de cálcio pelo mesmo sistema de transporte através da membrana plasmática (Lopes, 1990). De acordo com Lima (2019), a concentração de cálcio para obter-se adequada fermentação alcoólica é de 0,12 g.L<sup>-1</sup>, já para a Lopes (1990) uma pequena quantidade no mosto seria suficiente para as necessidades nutricionais da células, visto que a concentração do cálcio no vinho fermentado em geral é 2,8 vezes maior que a concentração de cálcio nas células de leveduras.

Portanto, notou-se que os efeitos inibitórios de crescimento da PE-2 estão ligados ao efeito sinérgico entre contaminação de uma levedura floculante selvagem (LFS) e a concentração de cálcio, que apesar das concentrações mais altas testadas (0,20 g.L<sup>-1</sup> e 0,30 g.L<sup>-1</sup>) não terem apresentado sobreposição da contaminante à linhagem industrial, essas mesmas concentrações também obtiveram resultados fermentativos desfavoráveis, como baixa produção de etanol e alta produção de glicerol e ácido acético.

Na Figura 13 estão os resultados com reutilização do inóculo com a pior condição encontrada nos resultados da Figura 12.

**Figura 13** - Resultados de predominância da PE-2 com níveis de contaminação inicial de 30 % de LFS em mosto acrescido de óxido de cálcio nas concentrações 0,10 g.L<sup>-1</sup> e com reutilização do inóculos por 3 fermentações.



Na Figura 13 estão os resultados de três fermentações consecutivas com reutilização do inóculo nas condições de cultura mista da PE-2 e LFS e com  $0,10 \text{ g.L}^{-1}$  de óxido de cálcio. Pôde-se observar na dinâmica populacional uma tendência de redução na linhagem industrial PE-2 no final da fermentação, o que pode levar a completa substituição dessa linhagem por cepas selvagens.

Essa situação quando ocorrida na indústria é comum a aplicação de antibióticos, porém os inibidores microbianos são mais eficientes em bactérias, como já observado no estudo de Alves (2011), a aplicação de antibiótico controlou a infecção de bactérias, porém o índices de leveduras flocculante no processo continuaram elevados, o método citado no estudo para contornar a infecção por leveduras selvagens foi a adição de mais leveduras industriais. Contudo, a troca completa do fermento é uma alternativa bem cara para as usinas, e trabalhar com métodos preventivos para o problema são mais convenientes financeiramente para a indústria do que os métodos corretivos.

Para solucionar problemas por contaminação de leveduras selvagem é necessário compreender as causas ligadas ao seu desenvolvimento. A baixa produtividade de etanol e a baixa eficiência fermentativa observadas nessa pesquisa estão ligadas à infecção pela LFS, que por consequência teve seu desenvolvimento impulsionado pela presença de cálcio no mosto.

Estas observações foram de extrema relevância, visto que na usina em questão foi observado a incorporação não intencional de uma levedura flocculante, no qual foi capaz de sobrepor cepas industriais devido a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no processo de obtenção do mosto para fermentação. Mudanças no processo são necessárias visando a minimização de prejuízos. Dentre eles pode-se mencionar a possibilidade de substituição do óxido de cálcio ou alternativas que reduzir a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no mosto para que não privilegie o desenvolvimento de leveduras flocculantes.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que as amostras do caldo bruto, mosto, mel final, fermento do pé-de-cuba e vinho fermentado da usina em estudo apresentaram um número significativo de micro-organismos como contaminante do processo de produção de etanol, apenas a amostra do caldo decantado não apresentou contaminação. O resultado mais preocupante foi na amostra do vinho fermentado, onde e 77,4 % dos indivíduos presentes eram de leveduras selvagens com característica de floculantes.

O desempenho fermentativo da levedura isolada do vinho fermentado (LFS) apresentou valores de concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto, produtividade e eficiência fermentativas mais baixos em comparação com linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2.

Em ensaios fermentativos com mosto sintético e cultura mista da LFS com as linhagens BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, os experimentos mostraram que em nível de contaminação de até 30 % de LFS, a produtividade e a eficiência fermentativas dessas linhagens não diferenciaram estatisticamente de seus desempenhos em cultura pura da FT-858L e PE-2, e com a linhagem BG-1 a queda foi significativa na eficiência e no fator de conversão de etanol nas fermentações a partir de 20 % de LFS e com a linhagem CAT-1 a partir de 2% de LFS.

Nas fermentações com reutilização do inóculos, a LFS foi reduzida de 30 % para 0,2 % no final de 10 fermentações consecutivas.

No entanto, em fermentações da LFS com a linhagem PE-2 em mosto com concentrações de óxido de cálcio entre 0,05 g.L<sup>-1</sup> e 0,30 g.L<sup>-1</sup>, mostraram queda significativa na eficiência fermentativa.

O mosto da usina apresentou concentração adicional de cálcio de 0,09 g.L<sup>-1</sup> após o tratamento de calagem, ficando bem próximo da concentração de 0,10 g.L<sup>-1</sup>, no qual em ensaios no laboratório nessa concentração observou-se na análise de competência que a velocidade de crescimento da LFS foi maior que da linhagem PE-2.

Assim, considerando a importância do etanol no mercado, o presente estudo evidencia a relevância de realizar o monitoramento da qualidade do mosto e fermento que estão sendo utilizados, avaliando a possibilidade de redução no teor de cálcio no mosto, para que evite potencializar a dominância de linhagens floculantes de baixo rendimento fermentativo. Essas

informações podem evitar prejuízos financeiros considerando as quedas no rendimento e os grandes volumes de produção industrial, como também pode evitar a troca completa do fermento, no caso de situações mais críticas.

## REFERÊNCIAS

- ALCOBA-FLÓREZ, J.; ARÉVALO-MORALES, M. P.; PÉREZ-ROTH, E.; LAICH, F.; RIVERO-PÉREZ, B.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Yeast molecular identification and typing. *In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ED). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Badajoz: Formatex, v. 2, p. 535-546, 2007. ISBN 9788461194223.*
- ALMEIDA, I. L. L. **Análise da geração de energia elétrica através da biomassa da cana-de-açúcar: um estudo de caso.** 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- ALVES, D. M. G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica.** 118 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.
- ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*.** 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- ALVES, P. C. O. Comportamento de Leveduras Selvagens em Fermentação no Setor Sucroalcooleiro. **Revista Cognitio**, n.1, 2011.
- AMORIM, H. V. **Quanto Custa Selecionar uma Levedura Industrial?.** *In: V Semana de Fermentação Alcoólica “Jayme Rocha de Almeida”, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2011.*
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C. BUCKERINDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, Springer-Verlan, v. 91, p. 1267-1275, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3437-6
- 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., Rio de Janeiro, 1981. Anais. STAB, Piracicaba, p. 158-168, 1981.*
- ANDRADE, E. T.; CARVALHO, S. R. G.; SOUZA, L. Programa do Proálcool e o Etanol no Brasil. **Engevista**. v. 11, n. 2., p. 127-136, 2009. DOI: 10.22409/engevista.v11i2.236

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processos utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB**, Piracicaba, v. 13, n. 4, p. 22-25, 1997. DOI: 10.1590/S1413-70542009000700048

ANDRIETTA, M. G. S., ANDRIETTA, S. R., STECKELBERG, C., STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proalcool. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 195-200, 2007.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. S. Uma nova visão da microbiota de leveduras habitantes do processo de produção de etanol brasileiro. **STAB**, Piracicaba, v. 30, n. 2, p. 42-47, 2011.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB**, Piracicaba, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.

ARGUESO J. L.; PEREIRA, G. A. G. Perspective : Indigenous sugarcane yeast strains as ideal biological platforms for the delivery of next generation biorefining technologies. **International Sugar Journal**. v. 112, p. 86–89, 2010.

AQUINO, A. F.; BIDÔ, É. S.; GALVÃO, M. L. M.; OLIVEIRA, V. N. Etanol da Cana de Açúcar: Possibilidades Energéticas da Região de Ceará-Mirim-RN. **HOLOS**, Ano 30, v. 01, p. 105-125, 2014. DOI: 10.15628/holos.2014.713

AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003

BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIC, M. K.; BAJPAI, R.; STAHL, U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 371–387, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04659.x

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.002

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R.; MORAIS, J. O. F.; SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAES, M. A.; SIMÕES, D. F. T. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. **Current Microbiology**, v. 56, p. 322-326, 2008. DOI: 10.1007/s00284-007-9085-5

BASSO L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L.; Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 1155–116, 2008. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects*, **IntechOpen**, 2011. DOI: 10.5772/1704

BERG, M. VAN DEN; STEENSMA, H. Y. ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, p. 704–713, 1995. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20751.x

BREXÓ, R. P.; SANT’ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.01.151

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de Leveduras no Processo de Fermentação Alcoólica em Usina do Estado de São Paulo, BRASIL. **Sci. agric.**, Piracicaba , v. 56, n. 1, p. 207-216, 1999 .

CASTRO, B. A. A. Análise do Setor Sucroenergético do Triângulo Mineiro. **SEBRAE Minas**, Belo Horizonte, p. 54, 2018.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 179 f. Dissertação (Mestrado em Ciência), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; Microbiologia da Fermentação Alcoólica: A importância do Monitoramento Microbiológico em Destilarias. **Coleção UAB-UFSCar**, p. 105, 2010. ISBN – 978-85-7600-222-2

CECCATO-ANTONINI, S. R.; PARAZZI, C. Isolamento de Levedura Selvagem Floculante e Efeitos da Contaminação em Processo de Fermentação Etanólica Continua. *In: Congresso Nacional Da Sociedade Dos Técnicos Açucareiros Do Brasil*, Maceió, 1996. Anais. **STAB**, p. 23- 29, 1996.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica**. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. Tecnologia e fabricação do álcool. **E-Tec Brasil**, Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 74, 2012.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, quarto levantamento, v. 5, Safra 2018/19, n.4. Brasília: **CONAB**, 2019.

CROCOMO O. J.; GUTIERREZ, L.E. Caminhos Metabólicos. *In*: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial - Volume 1: Fundamentos. **Ed. Edgard Blücher Ltda.**, São Paulo, p. 288, 2001. ISBN: 9788521202783

CRUZ, M. L. **Avaliação de Condições Operacionais na Fermentação Alcoólica VHG Empregando Diferentes Cepas de *Saccharomyces Cerevisiae***. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

EL-BANNA, A. A.; MALAK, A; SHEHATA, M. G. Yeasts producing Killer toxins: An Overview. **Alex. J. Fd. Sci. & Technol**, Alexandria, v. 8, n. 2, p. 41-53, 2011.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Zymomonas mobilis: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009. DOI: 10.5433/1679-0359.2009v30n2p361

FERMENTEC. Leveduras Personalizadas. Leveduras com habilidade melhorada que apresentam alta persistência e dominância. **Fermentec**, 2020. Disponível em: <https://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259>. Acesso em: 03.04.2020

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

GUTIERREZ, L. E. Produção de Glicerol por Linhagens de *Saccharomyces* Durante Fermentação Alcoólica. Anais. **ESALQ**, Piracicaba-SP. v. 48, p. 55-69, 1991.

LACHANCE, M. A. Yeast biodiversity: how many and how much? *In*: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Berlin and Heidelberg: **Springer-Verlag**, p. 1-9, 2006. ISBN 978-3-540-26100-1. DOI: 10.1007/3-540-30985-3

LIMA, A. U. Produção de Etanol com Matéria-prima Sacarina. *In*: LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processos fermentados e enzimáticos. 2ª Edição. **Ed. Edgard Blücher Ltda.**, São Paulo, p. 760, 2019. ISBN: 9788521214571

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. Álcool Carburante – Uma estratégia brasileira. **Editora UFPR**, Curitiba, 2002. ISBN: 8573350881

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. *In*: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processo fermentativo e enzimático. 1ª Edição. **Ed. Edgard Blücher Ltda.**, São Paulo, p. 616, 2001. ISBN: 9788521202806

LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: Tecnologia de produção de etanol. **Coleção UAB–UFSCar**. São Carlos, 2011.

LOPES, J. J. C. **Balanço De Nutrientes Minerais No Processo Melle-Boinot De Fermentação Alcoólica**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

LOPES, M. L. PAULILLO, S. C. DE L.; CHERUBIN, R. A.; GODOY, A.; AMORIM-NETO, H. B.; AMORIM, H. V. Leveduras Personalizadas Para Produção De Etanol : Seleção Dirigida Pelo Processo. 1ª Edição. **Fermentec**, 2015. ISBN: 978-85-99011-03-4

LUCENA, B. T.; SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L.; MOREIRA, A. P.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS JR, M. A.; Diversity of Lactic Acid Bacteria of the Bioethanol Process. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 298, 2010. DOI: 10.1186/1471-2180-10-298.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Food Science and Technology**, v. 21, n. 1, p. 63-66, 2001. DOI: 10.1590/S0101-20612001000100014.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Revista Política Agrícola**, ano 15, n 3, p. 64-78, 2006.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock. 14ª Edição. **ArtMed**, Porto Alegre, p.1032, 2016. ISBN: 9788582712979

MELO, G. Elanco e os Processos de Fermentação Alcoólica: Uma história de qualidade. **Elanco – Divisão da Eli Lilly do Brasil Ltda**, 2004.

MOREIRA, B. L. D.; PARAZZI, C.; PAPIN, L. F.; LOPES, J.; JOSÉ C. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, 2013.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B.; Epigenética: um Novo Campo da Genética. RUBS, Curitiba, v.1, n.3, p. 61-69, 2008.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007. DOI: 10.1590/S0101-20612007000100004

OLIVA-NETO P, YOKOYA F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World J Microbio Biotechnol.**, v. 10, p. 697-699, 1994.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A; SERRA, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.19–24, 2004. DOI: 10.1023/B:WIBI.0000013286.30695.4e

PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera, **Química Nova**, v. 21, n. 6, 1998. DOI: 10.1590/S0100-40421998000600015

PÉTER, G.; ROSA, C. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. **Springer Berlin Heidelberg**, Berlin, Heidelberg, 2005. ISBN 978-3-540-26100-1. DOI: 10.1007/3-540-30985-3

PHUKOETPHIM, N.; SALAKKAM, A.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L.; Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes, **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 84-92, 2017. DOI: 10.1016/j.ejbt.2017.01.005

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2948–2953, 1992.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de Linhagens de Levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a Fermentação do Caldo de Cana. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 255-263, 1999. DOI: 10.1590/S0103-90161999000200001

RIZZON, L. A. Sistema de Produção de Vinagre. Fermentação acética. **Embrapa Uva e Vinho**, Sistemas de Produção, n. 13, Versão Eletrônica, 2006. ISSN 1678-8761

ROEHR, M. The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. **WILEY-VCH**, Weinheim, p. 244, 2001. ISBN: 3-527-30199-2

RUSSELL, I.; Yeast and management of fermentation. *In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R.*. The Alcohol Textbook. 4ª Edição. **Alltech Inc**, Nottingham, 2003. ISBN 1-897676-13-1

SANTOS, M. A.; SOUZA, A. C. C. Aspectos da conversão de glicerol em etanol: análise bibliográfica. **ENAPEX**. p. 16, 2011.

SANTOS, M. V. **Estudo da Competência de *Saccharomyces Cerevisiae* em Co-Cultura para a Produção de Etanol**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2017.

SILVA, F. C. Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes. 2ª Edição. **EMBRAPA**, Informações Tecnológica, Brasília, 2009.

SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. DE L.; SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S.; SANTANA, D. P. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000500024

SILVA, M. C. S. Contaminação Bacteriana do Processo de Fermentação Etanólica e suas Implicações. **COSIMP**, Cascavel, 2016.

SOUSA, J. L. U; MONTEIRO, R. A. B. Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de Etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 100-107, 2011.

SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R.; Flocculação de Leveduras por *Lactobacillus Fermentum* em Processos Industriais de Fermentação Alcoólica Avaliada por Técnica Fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2004. DOI: 10.1590/S1413-70542004000400023

SOUZA-LIBERAL A. T.; BASÍLIO A. C. M.; MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B. T. V.; SILVA-FILHO, E. A.; MORAIS, J. O. F.; SIMOES, D. A.; MORAIS JUNIOR M. A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 538–547, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03082.x

SOUZA-LIBERAL, A.; SILVA-FILHO, E.; MORAIS, J.; SIMÕES, D.; MORAIS, M. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p.19-23, 2005. DOI: 10.1111/j.1472-65X.2004.01618.x

STANISZEWSKI, M.; KUJAWSKI, W.; LEWANDOWSKA, M. Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative

recovery of product – Kinetic model predictions, **J. Food Eng.**, v. 82, p 618–625, 2007. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2007.03.031

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 250 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2001

STROPPA, C. T. ALVES J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F.; CASTRO, C. C. Parâmetros Cinéticos de Linhagens de Levedura Isoladas de Alambiques Mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. spe, p. 1978–1983, 2009. DOI: 10.1590/S1413-70542009000700048.

TÁVORA, F. L. História e economia dos biocombustíveis no Brasil. Brasília: **Senado Federal**, Centro de Estudos da Consultoria do Senado. Textos para Discussão 89, 2011.

TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; SOUSA, M.; SIL, C. Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 5, p. 197-203, 1995. DOI: 10.1016/0927-7765(95)01227-A.

TELEKEN, J. G. Bioetanol. Tecnologia em Biocombustível – UFPR. Palotina - PR, 2014.

TONIATO, J. **Determinação de Parâmetros Cinéticos de Fermentação Alcoólica em Diferentes Substratos**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu, 2013.

TONOLI, F. C. **Adaptação das Leveduras para Fermentação com Alto Teor Alcoólico**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

VASCONCELOS, J. N. de. Fermentação Etanólica. *In*; SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologias e perspectivas. 22. **Ed. Viçosa**: UFV, p. 401-437, 2010.

VIANA, N. C. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

VOLPES, P. L. O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **Química Nova**, v. 20, n. 5, 1997.

XAVIER, M. C. The Brazilian Sugarcane Ethanol Experience. **Advancing Liberty From the Economy to Ecology**. n. 3, 2007.

## ANEXOS

### Anexo A - Composição química do mosto de cana-de-açúcar.

	<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Açúcares	D(+) Sacarose	129,24
	D(+) Glicose	10
	D(-) Frutose	10
Sais Minerais	Fosfato de Potássio Monobásico	0,75
	Sulfato de Potássio	0,5
	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,25
	Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,155
	Cloreto de Sódio	0,2
Aminoácido	Tirosina	0,03
	Isoleucina	0,067
	Ácido Aspártico	0,16
	Ácido Glutâmico	0,17
	Arginina	0,07
	Leucina	0,13
	Treonina	0,006
	Glicina	0,123
	Alanina	0,113
	Valina	0,110
	Metionina	0,014
	Fenilalanina	0,067
	Serina	0,085
	Histidina	0,025
Lisina	0,046	
Ácidos	D-L Ácido Málico	1,8
	Ácido Cítrico	8
Vitaminas	D-biotina	0,002
	Cálcio d-Pantotenato	0,04
	Ácido Nicotínico	0,04
	Myo-Inositol	0,965
	Cloridrato de Tiamina	0,04
	Cloridrato de Piridoxal	0,04
	Ácido p-Aminobenzóico	0,008

		(Continuação)
<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>	
	EDTA Sal Dissódico	0,015
	Sulfato de Zinco Hephidratado	0,0045
	Cloreto de Manganês II	0,001
	Cloreto de cobalto hexahidratado	0,0003
Elementos traços	Sulfato de Cobre II	0,0003
	Molibdato de Sódio Dihidratado	0,0004
	Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,0045
	Sulfato de Ferro	0,003
	Ácido Bórico	0,001
	Iodeto de Potássio	0,0001