



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



***EFICIÊNCIA DE PROCESSO TÉRMICO PARA MOSTOS A  
BASE DE CALDO DE CANA E MELAÇO NA PRODUÇÃO  
DE BIOETANOL***

**Jonas Nolasco Jr.  
(Engenheiro Químico)**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Pilar Rodriguez de Massaguer, PhD.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de Doutor  
em Ciência de Alimentos

Campinas – SP – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

N712e Nolasco Junior, Jonas  
Eficiência de processo térmico para mostos a base de caldo de cana e melaço na produção de bioetanol / Jonas Nolasco Junior. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Pilar Rodriguez de Massaguer  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Processo térmico. 2. Caldo de cana. 3. Bioetanol. 4. Fermentabilidade. 5. Otimização. I. Massaguer, Pilar Rodriguez de. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Efficiency of thermal process for musts based on sugar cane juice and molasses for bioethanol production

Palavras-chave em inglês Keywords): Thermal process, Sugar cane, Bioethanol, Fermentability, Optimization

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Pilar Rodriguez de Massaguer

Carlos Eduardo Vaz Rossell

José Roberto Ernandes

Cristiana de Paula Pacheco

Marcelo Cristianini

Data da defesa: 30/07/2010

Programa de Pós Graduação:Programa em Ciência de Alimentos

***Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida em 30/07/2010  
por Jonas Nolasco Junior aprovado pela comissão julgadora em 30/07/2010.***

---

***Professora Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer***

***(Orientador)***

---

***Professor Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell***

***(Membro)***

---

***Professora Dra. Cristiana de Paula Pacheco***

***(Membro)***

---

***Professor Dr. Fumio Yokoya***

***(Membro)***

---

***Professor Dr. José Roberto Ernandes***

***(Membro)***

---

***Professora Dr. Marcelo Cristianini***

***(Membro)***

---

***Professora Dra. Telma Teixeira Franco***

***(Membro)***

## **AGRADECIMENTOS**

***Quero agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste projeto, em especial agradeço:***

- À minha esposa Ângela e meu filho Matheus pela compreensão durante minhas ausências.
- À minha orientadora, Professora Pilar, pela orientação e ensinamento.
- Ao Dr. Rossell, sempre um grande incentivador desse projeto.
- Aos amigos do Laboratório de Termobacteriologia pela amizade e ajuda: Alessandra Marques (Lê Mãe), Rafael, Salatir, Dra Cris, Rosinha, Paula (GMO), Aninha.

***“Tudo que um sonho precisa para ser realizado é de alguém que acredite que ele possa ser realizado”.***

*Roberto Shinyashiki*

***“... fermento, logo, existo...”***

*Paul William Hill*

*À minha amada esposa e meu filho, dedico*

## **INDICE**

<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
--------------------	-----------

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
----------------------	-----------

<b>NOMENCLATURA GERAL .....</b>	<b>xiii</b>
---------------------------------	-------------

<b>Capítulo 1 .....</b>	<b>1</b>
-------------------------	----------

1.1 Introdução .....	2
1.2 Objetivo geral .....	5
1.3 Objetivos específicos .....	5

<b>Capítulo 2 .....</b>	<b>7</b>
-------------------------	----------

<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
--------------------------------------	----------

2.1. Bactérias contaminantes em mostos, fermentação alcoólica e prejuízos causados.....	8
2.2. Resistência térmica dos contaminantes de mostos e fermentação alcoólica.....	19
2.3. Tratamentos de controle de contaminantes propostos e resultados .....	23
2.4. Otimização de processos térmicos .....	35
2.5. Riscos associados ao uso intensivo de antibióticos no controle da contaminação .....	37
2.6. Fertirrigação: efeitos da vinhaça no solo.....	42
2.7 A Evolução tecnológica na produção de bioetanol no Brasil.....	48
2.8 Referências Bibliográficas .....	58

<b>Capítulo 3.....</b>	<b>71</b>
------------------------	-----------

<b>Verificação experimental de processo térmico para mostos a base de caldo de cana e melaço para produção de bioetanol em unidade piloto de esterilização contínua .....</b>	<b>72</b>
---	-----------

Resumo .....	73
Aplicações Práticas .....	73
Introdução .....	74
Material e Métodos .....	77
Preparo do mosto .....	77
Suspensão de esporos principal .....	78
Suspensão de esporos para inoculação em mostos .....	79
Unidade Piloto de esterilização Contínua .....	79
Processos térmicos .....	80
Definições dos processos térmicos utilizados.....	81
Condições de processos térmicos aplicados .....	82
Histórico de processo, perfil de temperatura e letalidade dos processos térmicos. ....	83
Plano de amostragem e analítico durante o processo térmico .....	86
Processo CIP/SIP aplicado à unidade piloto de esterilização térmica .....	87
Resultados e Discussão .....	87
Conclusão .....	95
Agradecimentos .....	95
Nomenclatura .....	95
Referências.....	98

APÊNDICE A- Dados operacionais dos processos térmicos para cálculo dos perfis térmicos...	125
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>142</b>
<b><i>Fermentabilidade de mostos tratados termicamente para produção de bioetanol</i></b> .....	<b>143</b>
Resumo .....	144
Aplicações Práticas .....	144
Introdução .....	145
Material e Métodos .....	149
Micro-organismos utilizados .....	149
Mosto utilizado .....	149
Estabelecimento dos parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em mosto, $\mu_{\text{máx}}$ , $\lambda$ , $N_{\text{final}}$ e cálculo do rendimento e da produtividade.....	150
Parâmetros de rendimento e produtividade .....	152
Preparo do inóculo para os ensaios de fermentação de mosto de caldo de cana e melaço .....	154
Fermentação .....	154
Resultados e Discussão .....	156
Conclusão .....	166
Sugestões .....	167
Agradecimento .....	168
Nomenclatura .....	168
Referências.....	171
ANEXO 1: Dados experimentais dos testes de fermentabilidade dos mostos tratados termicamente utilizando as linhagens LNF BG-1 e LNF SA-1.....	204
ANEXO 2: Banco de dados Controle Mútuo utilizado no âmbito das Usinas associadas ao Centro de Tecnologia Canavieira com dados da safra de 2005 .....	213
<b>Capítulo 5</b> .....	<b>218</b>
Conclusões gerais .....	219
Recomendações para continuidade em trabalhos futuros .....	220



## RESUMO

Nesta pesquisa foi verificada a eficiência de tratamento térmico UHT para mostos a base de caldo de cana e melaço, otimizado para preservação máxima (> 98,7%) do conteúdo dos açúcares sacarose, glicose e frutose causando 3 reduções logarítmicas no micro-organismo alvo, os esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 1518. Os mostos tratados termicamente tiveram suas características fermentativas avaliadas utilizando as linhagens industriais de leveduras LNF SA-1 e LNF BG-1, utilizadas na produção de bioetanol.

A eficiência dos processos térmicos otimizados foi avaliada em unidade piloto de esterilização contínua Microthermics® com aquecimento indireto utilizando os binômios 125°C/30s, 130°C/11s, 130°C/37s e 135°C/5s, selecionados a partir de estudos cinéticos de destruição térmica dos esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 1518 nas temperaturas 98°C, 110°C, 120°C, 122,5°C e 130°C e dos açúcares sacarose, glicose, frutose e açúcares redutores totais, ART, nas temperaturas 110°C, 120°C, 130°C e 140°C, utilizando como meio mosto a 21,5°Brix e pH 6. Os estudos cinéticos foram realizados em batelada com tubos TDT, 6 mm DI x 8 mm DE x 100 mm de comprimento. O protocolo de processo representado pelo binômio 135°C/5s foi obtido por extrapolação. O processo térmico contínuo se mostrou mais eficiente que o processo predito através dos ensaios cinéticos em batelada.

O número de reduções logarítmicas médio de 2,58 obtido experimentalmente, ( $n_{\text{integral-biológico}}$ ), em cada um dos protocolos de processo utilizado, foi 7,35% maior que os valores calculados de 2,41, ( $n_{\text{integral-calculado}}$ ),

utilizando os perfis de temperatura obtidos em cada uma das secções da unidade piloto de esterilização, estimados com a velocidade média de escoamento. A preservação da sacarose foi maior que 99,20% enquanto que a preservação dos açúcares redutores totais foi superior a 99,52%. Nos dois processos térmicos com os binômios 130°C/37s os valores de  $n_{\text{integral-biológico}}$  foram maiores que 5,87 e 7,47 e preservação dos açúcares mínima de 99,45%. Teoricamente qualquer dos protocolos de processos térmicos é capaz de causar  $10^8$  reduções logarítmicas nos *Lactobacillus sp*, contaminante comumente encontrados nos mostos durante fermentação.

Com relação às características fermentativas dos mostos tratados termicamente, as velocidades específicas máximas de crescimento diminuíram com o aumento da temperatura de tratamento térmico dos mostos de 0,42 h<sup>-1</sup> para 0,19 h<sup>-1</sup> para LNF SA-1 e de 0,57 h<sup>-1</sup> para 0,09 h<sup>-1</sup> para LNF BG-1. Os tempos de adaptação obtidos para a linhagem LNF SA-1 variaram de 3,10 h a 4,97 h, mas, em mostos tratados na temperatura mais elevada de 135°C por 5s, foi de 11,17 h. Para a linhagem LNF BG-1 os tempos de adaptação obtidos variaram de 5,92 h para 6,65 h para os binômios 125°C/30s, 130°C/11s e 130°C/37s, mas no tratamento com o binômio 135°C/5s foi obtido 10,88 h. A produtividade das leveduras ficou entre 0,24-0,34 g etanol/g de célula/h enquanto que o rendimento em etanol variou de 87,56% a 89,73%, valores dentro dos padrões industriais.

Máximo rendimento foi obtido quando foi utilizado mosto tratado a 130°C/37s em que foi obtido valor de  $n_{\text{integral-biológico}}$  maior que 5,87, indicando que os protocolos de tratamento térmicos podem ter exercido diferentes efeitos sobre a disponibilidade de macro e micro nutrientes essenciais para as leveduras.

## ABSTRACT

In this research is verified the efficiency of a UHT heat treatment process for musts based on sugar cane juice and molasses optimized for maximum preservation of the content in the sugars sucrose, glucose and fructose, using as target the heat resistant spores of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 1518. Heat treated musts had their fermentative characteristics evaluated using the industrial yeast strains LNF SA-1 and LNF BG-1 for the production of bioethanol in Brazil.

The efficiency of the thermal graphically optimized processes was assessed in continuous sterilization Microthermics® pilot plant with indirect heating following the binomials 125°C/30s, 130°C/11s, 130°C/37s and 135°C/5s, selected from thermal destruction kinetic studies of *G. stearothermophilus* spores at the temperatures 98°C, 110°C, 120°C, 122.5°C, 125°C and 130°C, and of the sugars sucrose, glucose, fructose and total reducing sugars, TRS, at the temperatures 110°C, 120°C, 130°C and 140°C, in must media, 21.5°Brix and pH 6.4. Kinetic studies were carried out in batch, using TDT tubes 6 mm DI x 8 mm DE x 100 mm length. The process condition of the binomial 135°C/5s was obtained by extrapolation. The continuous heat process was more efficient than the predicted from the batch kinetic tests.

The mean number, 2.58, of integral log reduction experimentally obtained for the target microorganism, ( $n_{\text{integral-biological}}$ ), was 7.35% higher than the mean number, 2.41, of integral calculated values, ( $n_{\text{integral-calculated}}$ ), using the temperature profile estimated for each of section of the pilot unit with the mean flow velocity. It was found that sugar retention in the musts thermally processed was

higher than 99.2% and 99.52% for sucrose and total reducing sugar, respectively. The two thermal processes that followed the binomial 130°C/37s resulted in  $n_{\text{integral-biological}}$  greater than 5.87 and 7.47 with minimal preservation of sugars of 99.45%. Theoretically any of these processes is capable of causing  $10^8$  decimal reductions on *Lactobacillus sp.*, typical contaminant found in musts and fermentation.

Fermentation characteristics of heat-treated musts were assessed and the kinetic responses of the yeasts in terms of their maximum specific growth rates, in the heat treated musts, decreased with increase in heat treatment temperature of the musts from 0.42 h<sup>-1</sup> to 0.19 h<sup>-1</sup> for LNF SA-1 and from 0.57 h<sup>-1</sup> to 0.09 h<sup>-1</sup> for LNF BG-1. The adaptation times obtained for strain LNF SA-1 varied from 3.10 h to 4.97 h, but in musts treated with the highest temperature, 135°C for 5s, the value was 11.17 h. For the strain LNF BG-1 the adaptation times varied from 5.92 h to 6.65 h, but in musts treated with the highest temperature, 135°C for 5s, the value was 10.88 h. Cell productivity was in the range of 0.24-0.34 g ethanol/g of cell/h and the yield was in the range 87.56 - 89.73%.

Maximum fermentation yield was obtained using musts treated with the binomial 130°C/37s, for which integral biological n-values found was greater than 5.87, suggesting that the thermal treatment protocols may have exerted different effects on availability of macro and micro essential nutrients for yeasts.

## NOMENCLATURA GERAL

°Brix	Medido com refratômetro, expressa a relação entre índices de refração a 20°C e a concentração de sólidos solúveis totais (%m/m) de solução aquosa pura de sacarose. Como o açúcar é o principal componente de mostos, xaropes, caldos e méis, a concentração de sólidos solúveis totais é uma boa aproximação da concentração de sacarose, sendo amplamente usada na indústria sucroalcooleira
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CTC	capacidade de troca de cátions
D	índice de redução decimal a temperatura constante (unidades de tempo)
D <sub>60C</sub>	índice de redução decimal a 60°C (unidades de tempo)
DBO	demanda bioquímica de oxigênio (mg/L)
DE	diâmetro externo (mm)
DI	diâmetro interno (mm)
DQO	demanda química de oxigênio (mg/L).
E <sub>a</sub>	energia de ativação, (KJ/mol)
ha	hectare igual a 10000m <sup>2</sup>
HTST	sigla em inglês “high temperature short time” ou alta temperatura pouco tempo de tratamento
K <sub>Acido</sub>	produção específica de acido em relação ao etanol produzido (g/g)

$K_{ART}$	açúcares residuais em relação ao etanol produzido (g/g)
$K_{Glicerol}$	produção específica de glicerol em relação ao etanol produzido (g/g)
$K_i$	constante de inibição pelo substrato na Eq. 2 (g/L)
$K_{Levedura}$	produção específica de levedura em relação ao etanol produzido (g/g)
$K_s$	constante de inibição pelo substrato na Eq. 1 e Eq.2 (g/L)
$n_{integral-biológico}$	número total de reduções logarítmicas experimentais, verificado entre a entrada e a saída do processo obtido a partir da diferença das contagens do micro-organismo alvo
$n_{integral-calculado}$	Número total de reduções logarítmicas calculado, verificado entre a entrada e a saída do processo
$^{\circ}Be$	densidade específica de soluções. Na indústria sucroalcooleira é usada para expressar a concentração de leite de CaO ( $1^{\circ}Be = 2$ g de substância seca/100 ml de solução)
$P_i$	concentração de produto no biorretor i na Eq. 2 (g/L)
$P_{max}$	Concentração máxima de produto (g/L)
$R_{SP}$	rendimento por subprodutos (%)
$S$	concentração de substrato na Eq.1 (g/L)
$S_i$	concentração de substrato no biorretor i na Eq. 2 (g/L)
UHT	sigla em inglês: “ultra high temperature” ou ultra alta temperatura
$Y_N$	fator de potência de inibição pelo produto
$Z$	coeficiente térmico para reduzir o valor D a 10% do seu valor inicial (unidades de temperatura)

$\mu$	velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{max}}$	velocidade específica máxima de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

# Capítulo 1

Introdução



## **1.1 Introdução**

O agronegócio sucroenergético na safra 2008/2009 movimentou R\$ 51 bilhões, correspondente a 1,76% do PIB nacional, recolheu R\$13 bilhões em impostos e ainda gerou 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos. Neste período foram processadas 560 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para a produção de 32 milhões de toneladas de açúcar e 27 bilhões de litros de bioetanol. O setor exportou 20 milhões de toneladas de açúcar e 5 bilhões de litros de álcool contribuindo com 11 bilhões de dólares no saldo da balança comercial do Brasil (JornalCana, 2010). Estes números tornam o Brasil, o maior produtor mundial de cana e açúcar e o principal país do mundo a implantar, em larga escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo.

Devido às pressões mundiais para redução das emissões de gases de efeito estufa, aos altos preços e à insegurança de abastecimento do petróleo, a biomassa se apresenta como alternativa energética. Entre elas, a cana-de-açúcar exerce papel de destaque pela sua riqueza em açúcares facilmente extraíveis e pela sua composição de fibras e materiais lignocelulósicos com potencial para aumentar sua produtividade dos atuais 6000 litros/ha para 14000 litros/ha em 20 anos. Este aumento poderia fornecer excedentes de energia elétrica e etanol para suprir boa parte da demanda mundial por biocombustíveis a qual, de acordo com alguns cenários, poderia chegar a 200 bilhões de litros anuais para substituir 10% da gasolina consumida no mundo em 2025. A alcoolquímica baseada no bioetanol é outra potencial fonte de pressão por aumento da demanda do bioetanol a nível

mundial (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006).

A atratividade ambiental do bioetanol de cana-de-açúcar advém do fato que ele gera 8,3 unidades de energia renovável por unidade de energia fóssil consumida (MACEDO, 2005). Entretanto a atual base tecnológica de produção apresenta alguns passivos ambientais que carecem de soluções tecnológicas, como, por exemplo, a excessiva produção de vinhaça, o principal resíduo do setor sucroalcooleiro (12-14 L/L de bioetanol produzido), como consequência de processos de fermentação de baixo teor alcoólico (8,5 %v/v). Uma outra limitação é, em parte, atribuída à presença de contaminantes microbianos, que requerem o uso intensivo de antibióticos e biocidas para o seu controle. Mais de um terço de todas as perdas no processamento industrial do caldo de cana-de-açúcar está concentrado na fermentação (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1996).

Do ponto de vista da base tecnológica de produção, o gerenciamento do processo é baseado exclusivamente em estratégias corretivas, baseadas no uso intensivo de produtos químicos como ácido sulfúrico consumindo 5-8 kg/m<sup>3</sup> de bioetanol produzido e antibióticos consumindo 8,7 g/m<sup>3</sup> de bioetanol produzido, sendo ambos os dados de consumo referentes à safra 2005/2006 (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2006).

A chamada pressão antibiótica, referente à relação entre extensão de uso de antibióticos e seleção de cepas resistentes é assunto polêmico, mas o uso contínuo de antimicrobianos tem aumentado a resistência de várias bactérias aos antimicrobianos comuns (WANNMACHER, 2004). Um dos principais usos não humanos de antibióticos é em nutrição animal na suinocultura e avicultura, como

promotores de crescimento. Essa prática tem sido apontada como uma das principais fontes não humanas, que sustenta o aparecimento de bactérias nocivas ao Homem e resistentes a antibióticos (VAN DEN BOGAARD et al., 2002).

Assim, a produção em larga escala de biocombustíveis no Brasil e mundo, baseada no uso intensivo de antibióticos, e se apresenta como mais um setor a contribuir para a crescente resistência a antibióticos (STROPPIA et al., 2000). A Administração de Drogas e Alimentos Americana (FDA) banuiu o uso de uma classe particular de antibióticos chamada fluoroquinolonas na criação de frangos ao passo que no âmbito da União Européia, nova regulamentação proibiu totalmente o uso de antibióticos como promotores de crescimento a partir de 2003 inclusive, a monensina sódica, a salinomicina sódica, a avilamicina e o flavofosfolipol que não são usados na medicina humana (LEDERGERBER et al., 2003; EUROPA, 2003). Uma eventual generalização da restrição do uso intensivo de antibióticos vai impor perdas consideráveis ao setor sucroalcooleiro brasileiro. É importante que sejam estudadas tecnologias alternativas para a produção do etanol brasileiro com mais eficiência e sem os impactos ambientais negativos do uso intensivo de antibióticos.

Nesse contexto o setor sucroenergético brasileiro deve estar equipado com tecnologias robustas para enfrentar possíveis barreiras comerciais que possam ser levantadas, fundamentadas em questões ambientais e de saúde, sendo essa, uma justificativa principal para o presente projeto de pesquisa. Nessa direção, vale ressaltar que após pesquisa nas bases referenciais Web of Science, Compendex, Food Science and Technology e Scopus, nenhum trabalho foi localizado sobre

esterilização ou processos térmicos de mostos à base de caldo de cana e melaço, sendo, portanto, essa pesquisa inédita.

## **1.2 Objetivo geral**

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar as características fermentativas de mostos submetidos a tratamentos térmicos em unidade piloto de esterilização térmica contínua utilizada para verificação de processo térmico, otimizado e elaborado, a partir da cinética de inativação térmica de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 1518 e cinéticas de destruição térmica dos açúcares sacarose, glicose e frutose e ART do mosto, a fim de fornecer uma alternativa tecnológica robusta preventiva para o controle de contaminantes na fermentação e com isso contribuir para eliminação do uso intensivo de antibióticos nessa etapa do processo. Esse processo foi denominado de padronização microbiológica de mostos para fermentação alcoólica e foi otimizado para máxima preservação dos açúcares do mosto, bem como avaliar as características fermentativas do mosto submetido aos tratamentos térmicos.

## **1.3 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos da pesquisa foram:

1) Padronização físico-química do mosto.

1a) Padronização microbiológica através de processos térmicos para determinação da eficiência, em unidade piloto contínua de esterilização, do processo térmico desenhado por Nolasco Junior (2005) para causar redução de 3 ciclos logarítmicos na população inicial de esporos *G. stearothermophilus* ATCC 1518.

1b) Cálculo dos protocolos de processos térmicos.

1c) Determinação do plano de amostragem da verificação do processo térmico

2) Avaliação da fermentabilidade, para produção de álcool combustível, dos mostos padronizados nos itens 1 e 1a, utilizando as linhagens LNF SA-1 e LNF BG-1 usadas industrialmente na produção de bioetanol. A fermentabilidade foi avaliada medindo respostas cinéticas de crescimento e parâmetros de rendimento e produtividade em ensaios de fermentação.

Os resultados esperados são a comprovação da eficiência do processo térmico desenhado através de dados cinéticos obtidos em batelada para operação em modo contínuo, sem formação de produtos inibidores para as leveduras na fermentação. Do ponto de vista industrial, mostos padronizados físico-químico e microbiologicamente são necessários para propiciar condições para que o processo de fermentação alcoólica opere de forma estável, no limite da álcool tolerância das leveduras industriais, sem uso de antibióticos e com menor consumo de ácido, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia de produção de bioetanol no Brasil. Esse projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Termobacteriologia/Departamento de Ciência de Alimentos/Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP).

# **Capítulo 2**

## **Revisão Bibliográfica**

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Bactérias contaminantes em mostos, fermentação alcoólica e prejuízos causados**

Micro-organismos são genericamente introduzidos nos processos industriais, em geral por diferentes fontes, como solo aderido à matéria prima e água de lavagem, durante a extração do caldo, água de processo e através do ar. A população de bactérias no solo é da ordem de  $10^9$ /grama. O ar representa uma fonte importante de introdução de micro-organismos tanto na produção de açúcar como na produção de etanol porque alguns equipamentos incorporam ar não estéril, como as centrifugas de açúcar ou as centrifugas de recuperação de fermento, nos processos de fermentação alcoólica com reciclo de células. No primeiro caso, além do açúcar, também contaminam o melaço que juntamente com o caldo vai compor o mosto para produção de bioetanol. O pó de açúcar presente na sala de secagem e de ensaque de açúcar é aspirado e coletado com água, e junto com o melaço também vai compor o mosto que é usado na fabricação do bioetanol. Há também alguns casos de prática de aeração principalmente na etapa de tratamento do fermento previamente ao reciclo de células, em que o ar utilizado não é estéril. Nesses casos, a contagem e diversidade da microflora introduzida dependem das condições de colheita e estocagem, do gerenciamento dos circuitos de água e de parâmetros operacionais como pH e temperatura.

A microflora do agrossistema de cana-de-açúcar brasileiro tem sido objeto de muitos estudos, dada à importância desse setor na economia do Brasil. Essa importância cresce a cada ano devido à importância do bioetanol como única

alternativa imediata de produção de combustível renovável em escala comercial para substituição de combustíveis fósseis. Nesta revisão podem ser encontrados trabalhos referentes à microflora contaminante dos agrossistemas de milho, beterraba e compostos lignocelulósicos, estes últimos relacionados com a produção de biocombustível de segunda geração (KLAUSHOFER et al.,1998; SKINNER; LEATHERS, 2004; SCHELL et al., 2007). A importância desses estudos recai sobre o fato de que a microflora característica desses agrossistemas frequentemente está associada a perdas, qualquer que seja a biomassa considerada: cana-de-açúcar, milho, beterraba ou compostos lignocelulósicos.

As várias etapas do processamento do caldo de cana, envolvidas na produção de açúcar e álcool, apresentam características específicas de temperatura e pH que exercem pressões seletivas definindo os grupos microbiológicos contaminantes característicos de cada etapa do processo. No agrossistema de cana-de-açúcar, os micro-organismos de importância no setor de extração do caldo são essencialmente aqueles oriundos do solo e vegetais. Dentre esses, os fungos, as leveduras, as bactérias lácticas e esporogêneas estão presentes em um ou mais pontos da usina. Na extração por difusor a temperaturas acima de 70°C, os micro-organismos significativos são os termofílicos e formadores de esporos, sendo *G. stearothermophilus* o mais importante, porém, não o único. Na expansão do setor sucroalcooleiro, verificada a partir de 2004, a maioria dos projetos visou a produção exclusiva de bioetanol e tecnologia de extração do caldo com difusor em temperaturas acima de 70°C. Na extração mecânica do caldo em moendas a temperaturas menores que 40°C, as bactérias termofílicas e esporogêneas têm uma importância relativa, mas as bactérias



láticas são extremamente importantes nessa fase do processo e também no setor de fermentação, como principais promotores da fermentação indesejável (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1983; KLAUSHOFER et al., 1998). Já as bactérias do ácido acético, *Acetobacter*, têm alguma importância no setor de moendas e nas peneiras removedoras de bagacilho, partes mais expostas ao ar (MAEDA, 1999).

Gallo e Canhos (1991) identificaram, em nível de espécie, um total de 334 isolados bacterianos de mostos e de dornas de fermentação. De acordo com os autores, os contaminantes bacterianos mais importantes no processo de fermentação alcoólica eram as bactérias Gram-positivas (98,52%), Gram-negativas (1,48%), subdivididas em bastonetes Gram-positivos (86,28%), sendo esporulados (26,05%) e não esporulados (73,95%), cocos Gram-positivos (12,24%) e bastonetes Gram-negativos (1,48%). Os gêneros bacterianos mais frequentes nas amostragens foram *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%). Em relação às espécies predominantes isoladas destacaram-se em ordem decrescente *B. coagulans*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *G. stearothermophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis* e *L. buchneri*. O autor atribuiu ao tratamento térmico do caldo a aproximadamente 100°C, o fato de não ter encontrado a bactéria *L. mesenteroides*, tão mencionada na literatura sobre contaminantes da fermentação alcoólica. Já Klaushofer et al. (1998) reportaram pesquisa sobre a população bacteriana conforme apresentado na Tabela-1, em cana-de-açúcar e caldo de cana. Nesses substratos foram identificados quatro grandes grupos gerais: (1) produtores de goma, incluindo *Leuconostoc sp*, (2) formadores de esporos

aeróbicos, como *Bacillus sp*, (3) aeróbicos não formadores de esporos como *Escherichia*, e (4) diversas leveduras e fungos.

Tabela 1. **Micro-organismos do agrossistema cana-de-açúcar no campo e na indústria.**

<b>Substrato</b>	<b>Micro-organismo (gênero)</b>
Cana-de-açúcar	<i>Leuconostoc</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Torula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Actinomycetes</i> , <i>Penicillium</i> .
Cana queimada	<i>Leuconostoc</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Bacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Torula</i> , <i>Rhodotoroula</i> , <i>Cândida</i> .
Caldo de Cana	<i>Leuconostoc</i> , <i>Pichia</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Achromobgacterium</i> , <i>Escherichia</i> .

Fonte: (KLAUSHOFER et al., 1998).

Nolasco Junior (2005) avaliou a carga microbiana à saída do decantador de caldo, processo que é conduzido tipicamente a 95-98°C com tempos de residência variando entre 50 minutos a 2,5 horas, a fim de desenhar um processo térmico para inativação dos contaminantes. Foram quantificados os grupos microbianos: esporos mesofílicos aeróbios, esporos mesofílicos anaeróbios, esporos termofílicos totais e produtores de acidez plana, bactérias lácticas, *Leuconostoc mesenteroides*, bactérias mesófilas aeróbias totais, bactérias sulfito redutoras e bolores e leveduras, em quatro usinas localizadas em regiões de clima diferentes em relação à umidade relativa do ar, temperatura média e tipos de solo quanto à capacidade de retenção de água. Os resultados obtidos na usina com predominância de solo arenoso e com baixa capacidade de retenção de água, revelaram diferença de 1 ciclo logarítmico nas contagens de esporos termofílicos

produtores de acidez plana, e bactérias mesofílicas aeróbias, sendo que os valores médios encontrados para esses grupos em regiões de solo com alta capacidade de retenção de água foram  $4,4 \times 10^1$  esporos/ml e  $4,63 \times 10^2$ , respectivamente. Considerando que a letalidade do processo de decantação do caldo é essencialmente igual em todas as Usinas, o autor concluiu que a localização geográfica e principalmente o tipo de solo influenciaram na carga contaminante aderida à matéria prima.

A ecologia microbiana da produção de etanol de milho nos Estados Unidos da América revela grupos semelhantes aos contaminantes do agro-sistema de produção de etanol de cana-de-açúcar do Brasil. Os isolados identificados em amostragens nas fermentações incluíam espécies dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weisella*, sendo que o gênero contaminante predominante foi o *Lactobacillus*, cuja incidência variou de 36% a 77% do total dos isolados dependendo da época e local de amostragem (SKINNER; LEATHERS, 2004). O mesmo foi encontrado no chamado etanol de segunda geração. Bactérias do gênero *Lactobacillus* representam o gênero contaminante predominante também na produção de etanol lignocelulósico de fibra de milho (SCHELL et al., 2007).

As destilarias da região nordeste brasileira ainda utilizam caldo cru ou caldo não clarificado na fermentação, realidade diferente da região centro-sul brasileira. Nessas usinas, além dos contaminantes bacterianos, leveduras selvagens não fermentativas já foram isoladas nos processos de fermentação, nos quais 24 espécies foram identificadas utilizando biologia molecular. Leveduras das espécies *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis*, bem como as

espécies de *Candida* que pertencem à chave intermediária de Cândida e que estavam envolvidas em episódios agudos de contaminação. Além disso, outras vinte (20) espécies se revelaram contaminantes acidentais (BASILIO et al., 2008). Nesta mesma pesquisa os autores observaram que as capacidades fermentativas de *D. bruxellensis* e *C. tropicalis* chegavam a apenas 45,7% e 63,2%, respectivamente, da capacidade fermentativa do isolado de *S. cerevisiae* industrial e que a presença desses contaminantes acima de certo limite, não especificado, na população de leveduras na fermentação poderia diminuir o rendimento industrial global em etanol.

Levantamento realizado em usinas cooperadas ao Sistema Copersucar mostrou que o setor de fermentação era responsável por 30 a 60% das perdas totais na indústria de açúcar e álcool, a maior parte devido aos contaminantes microbiológicos (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1996). Além das perdas, podem ser citados também dificuldades operacionais e aumento nos respectivos custos de produção devido a utilização contínua de antibióticos e desinfetantes químicos nas diversas etapas do processamento, para o controle dos referidos contaminantes.

Em monitoramento realizado em usinas de açúcar da África do Sul na extração do caldo por difusor, processo que ocorre a temperatura de 75°C, aproximadamente, o ácido láctico foi o principal ácido orgânico produzido por bactérias hipertermofílicas (MACMASTER; RAVNÖ, 1975). Já na extração por moagem nas usinas brasileiras as estimativas de perdas de sacarose associadas aos contaminantes variavam de 1 a 2,5 kg de sacarose/tonelada de cana,

dependendo das condições de higiene e operacionais (YOKOYA 1989 *apud* GALLO; CANHOS, 1991).

Dentre os problemas associados à presença de contaminantes na fermentação, a floculação da levedura foi apontada como um dos mais sérios na fermentação industrial de álcool. A redução na produção de álcool se dá pelo consumo de açúcar pelos contaminantes, consumo de álcool por algumas bactérias, morte de fermento por toxinas lançadas ao meio pelos contaminantes, morte do fermento por substâncias utilizadas no combate à contaminação, perda do fermento retido no fundo das dornas ou nas centrífugas, causada pela floculação e aumento do tempo de fermentação devido à queda do teor de fermento nas dornas, podendo uma contaminação violenta acabar com a fermentação (TROMBINI et al., 1988). O problema torna-se mais acentuado com o uso da reciclagem de células para aumentar a produtividade, reduzir o tempo e o custo da fermentação, porque essa prática tende a acumular a causa do problema a cada ciclo do processo (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). Durante a safra 1993/1994, aproximadamente 85% das floculações verificadas em usinas cooperadas ao sistema Copersucar foram causadas por bactérias<sup>1</sup>. Embora sacarolíticos, nem todos os contaminantes provocavam a floculação das leveduras. Os contaminantes *B. subtilis* e *B. coagulans* não provocavam floculação das leveduras, enquanto que alguns contaminantes do gênero *Lactobacillus* eram capazes de causar floculação das leveduras entre os quais *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* (YOKOYA;

---

<sup>1</sup> NOLASCO JUNIOR, J.; FINGUERUT, J. **Projeto floculação-fase I-caracterização e proposta de um índice de floculação**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1993. 12p. (RT-674/93).

OLIVA-NETO, 1991; ALCARDE; YOKOYA, 2003). Em teste de influência da proporção entre bactérias flocculantes do gênero *Lactobacillus* isoladas de fermentações e leveduras nas flocculações, observou-se que o nível seguro, à prova de flocculação, era  $10^3$ UFC/ml para as bactérias nas dornas de fermentação, ou seja, uma proporção de bactérias: leveduras de 1:100.000 (NOLASCO JUNIOR, 2005). O efeito da proporção entre células de bactérias e leveduras também foi avaliado por outros autores, sendo que esses expressaram as quantidades dos micro-organismos em massa seca (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991; BROMBERG; YOKOYA, 1995; LUDWIG; OLIVA-NETO; de ANGELIS, 2001; ALCARDE; YOKOYA, 2003). Os trabalhos sobre influência da proporção entre bactérias e leveduras na flocculação não são comparáveis pela falta de um fator de conversão de contagens de unidades formador de colônias em massa seca e vice-versa.

A interação entre contaminantes e leveduras vem sendo investigada no Brasil e no exterior em estudos de fermentação conduzidos com população mista em laboratório. Micro-organismos fastidiosos e exigentes de fatores de crescimento nutricionais essenciais, como os *Lactobacillus sp*, poderiam transformar leveduras mortas, mantidas no processo, como fonte abundante de fatores de crescimento pelos aminoácidos leucina, isoleucina, valina e vitaminas (OLIVA-NETO;YOKOYA, 1997). Estes autores estudaram a cultura mista levedura-*Lactobacillus* em condição de reciclo de células e constataram forte inibição das leveduras após 8-12 ciclos de fermentação quando a acidez da fermentação chegou a 15g/l. Esse estudo é muito relevante porque considerou o reciclo de células praticado nas fermentações industriais brasileiras. Sob este

enfoque, Oliveira-Freguglia e Horii (1998) relataram redução de 96% na viabilidade das leveduras em 12 horas em fermentações em batelada com cultura mista levedura-*L. fermentum*. Para Narendranath et al. (1997), a produção de ácido láctico e competição por fatores de crescimento essenciais no meio de fermentação são as causas da inibição das leveduras e redução no rendimento alcoólico quando lactobacilos estão presentes. Nobre, Horii e Alcarde (2007) avaliaram culturas mistas envolvendo levedura e bactérias do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus* e concluíram que a inibição das leveduras estava associada à acidez do meio e presença de bactérias ativas. Dorta et al. (2006) observaram que a presença de *Lactobacillos sp* e condições como alta temperatura, pH, acidez elevada, pressão osmótica e presença de sulfito agem com sinergismo e afetam negativamente o processo de produção de álcool, mas que o baixo pH (3,6) foi o principal fator estressante para as leveduras durante a fermentação alcoólica e que, portanto, o tratamento ácido do fermento precisaria ser reavaliado nesse caso.

Alvarenga (2008) desenvolveu modelos preditivos para crescimento e morte de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* em cultura pura e em cultura mista em ensaios de fermentação em batelada com mostos de caldo de cana e melaço. Em seu trabalho não constatou diferenças nos parâmetros cinéticos da levedura em cultura pura e em cultura mista, enquanto que *L. fermentum* teve sua população máxima afetada quando em cultura mista e dependente do seu inóculo inicial. A autora observou a influência do ácido láctico na atividade celular da levedura afirmando que quando a levedura atingiu a fase estacionária o lactobacilo teve sua taxa de crescimento aumentada, o que reforça trabalhos anteriores aqui citados

sobre a competição por nutrientes essenciais de crescimento que se estabelece entre essas populações (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997; NARENDRANATH et al., 1997). Outro fato relevante na pesquisa da autora foi o desenvolvimento de modelo para produção máxima de etanol mostrando interação significativa no parâmetro temperatura com efeito quadrático, e com o nível de inóculo inicial. Pelo modelo desenvolvido a autora determinou que máxima produção de etanol em fermentação com cultura mista levedura e lactobacilo em concentração de  $10^5$  UFC/ml pode ser atingida a temperatura de 28°C. É importante ressaltar que os processos de fermentação alcoólica brasileiros são conduzidos com reciclo de células e alta densidade celular, próximos do início da fase estacionária das leveduras.

Thomas, Hynes e Ingledew (2001) estudaram a influência do modo de operação da fermentação na dinâmica populacional envolvendo *Lactobacillus*-levedura, em fermentações de mosto de milho em sistema batelada utilizando os lactobacilos *L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. paracasei* e em sistema semi-contínuo utilizando o lactobacilo *L. fermentum*. Em batelada foram observadas reduções de até 22% no etanol produzido e aumento de até 46% na produção de glicerol pelas leveduras com impacto negativo muito grande no rendimento. As maiores perdas foram apuradas com *L. collinoides* e *L. fermentum*. Em modo semicontínuo, o processo de fermentação demonstrou ser autorregulável em favor da levedura que após o quarto ciclo de fermentação atingiu concentração igual ao experimento controle sem a presença do *L. fermentum*. Para os autores, fatores como competição por nutrientes essenciais e concentração crescente de etanol nos ciclos de fermentação podem ter inibido a



multiplicação de *L. fermentum*. As perdas de rendimento em etanol, segundo os mesmos autores, estão relacionadas com o nível de contaminação que depende do resultado da competição entre as espécies e se o mosto não é contaminado, a característica autorreguladora do processo semicontínuo restabelece a população de levedura e mantém a fermentação sem perdas apreciáveis de rendimento em etanol e viabilidade das leveduras. Bayrock e Ingledew (2001) demonstraram a autorregulação, em favor das leveduras, também de processos contínuos utilizando *L. paracasei*-levedura em fermentações de mosto de milho. Os autores mostraram que o pH da fermentação pode ser decisivo para definição da população dominante. Em pHs normais de fermentação (<4,75) o estado estacionário entre as populações indicou uma proporção igual a 1:100 na população de bactéria e levedura, respectivamente. Entretanto, em pH 6, o lactobacilo cresceu quase cinco (5) ciclos logarítmicos, quadruplicou a concentração de ácido láctico e inibiu totalmente a levedura. Os autores não discutiram o efeito da taxa de diluição na autorregulação dos processos semicontínuos (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001) e contínuos do trabalho (BAYROCK; INGLEDEW, 2001). A dinâmica populacional nestas duas últimas pesquisas mencionadas foi avaliada com pulso de contaminação seguida de alimentação com mosto estéril. Basso; Alves e Amorim (1997) reportaram que o ácido succínico produzido pelas leveduras desempenha importante papel na competição entre leveduras e bactérias contaminantes em cultura mista.

Quanto à capacidade de consumo dos açúcares sacarose e redutores, contidos no mosto, pelas bactérias contaminantes, Stroppa et al. (1998) constataram que a relação consumo de açúcar/crescimento celular para os

*Bacillus* foi 1,61 a 4,97 g/ciclo logarítmico enquanto que para *Lactobacillus*, 1,01 a 1,56 g/ciclo logarítmico. Esses dois trabalhos mostram que a contaminação por bactérias do gênero *Bacillus*, embora não associadas ao problema da floculação das leveduras, seriam mais prejudiciais à fermentação em termos de rendimento.

Skinner-Nemec, Nichols e Leathers (2007) demonstraram que contaminantes bacterianos, predominantemente bactérias produtoras de ácido láctico, de amostras de fermentações de etanol combustível de milho, em escala comercial, foram capazes de produzir biofilmes em condições de laboratório. Similarmente, Negro; Yokoya e Eberlin (2003) encontraram uma associação de leveduras e bacilos em amostragens realizadas em “canjicas” (material polimérico insolúvel em água) isoladas em usinas de açúcar e álcool. Esses estudos ajudaram a explicar porque a contaminação, em plantas comerciais, é resistente e de difícil controle, isto, pois, biofilmes, geralmente, protegem as bactérias quando do tratamento com agentes químicos e antibióticos (GILBERT; BROWN, 1995).

## **2.2. Resistência térmica dos contaminantes de mostos e fermentação alcoólica**

Numa revisão do efeito da temperatura sobre a funcionalidade de proteínas, carboidratos, lipídeos e micronutrientes em alimentos, Hardy; Parmentier e Fanni (1999) concluíram que o uso do tratamento térmico é ainda o processo industrial mais efetivo para preservação porque os efeitos positivos sobre as propriedades organolépticas e sensoriais prevalecem, sendo apenas uma questão de otimização. Adicione-se a isso o fato de que tratamentos térmicos não deixam resíduos tóxicos nos alimentos como os antibióticos. A maioria dos dados de destruição térmica dos micro-organismos contaminantes típicos de mostos e de

fermentação alcoólica (GALLO; CANHOS, 1991) foi determinada em água, leite ou soluções tamponadas (BUSTA, 1967; PERKIN et al., 1977; BURTON et al., 1977; DAVIES et al., 1977; PFLUG, 1990; WESCOTT; FAIRCHILD; FOEGEDING, 1995; ABRAHAM et al., 1990) e alguns poucos determinados na própria matriz mosto, como veremos a seguir.

Gouthier e Massaguer (1987) determinaram, através de cinéticas de primeira ordem, o tempo de redução decimal, D, para os esporos de *G. stearothermophilus* em caldo de cana à temperatura de 120°C, 130°C e 140°C, como sendo 11,3 minutos, 9,5 minutos e 8,1 minutos, respectivamente.

Franchi et al. (2003) determinaram o tempo de redução decimal a 60C, D<sub>60C</sub>, para as bactérias contaminantes do gênero *Lactobacillus*, em Usinas de açúcar e álcool, em meio de caldo de cana clarificado a 14Brix e pH=6,5. Entre as espécies testadas, a *L. confusus*, se mostrou a mais sensível não sendo possível a determinação do seu valor D<sub>60C</sub>, enquanto que *Leuconostoc mesenteroides* foi o mais resistente. Os valores de D<sub>60C</sub> obtidos foram: 0,75 minutos para *L. fermentum*, 0,29 minutos para *L. plantarum* e 1,57 minutos para *Leuconostoc mesenteroides*. Ainda de acordo com Franchi, Serra e Cristianini (2003), foi possível observar a ação sinérgica do tratamento térmico associado à ação da combinação de bioprotetores como Novasin (10ppm, contendo 1000000 UI/g de nisina), 30 ppm de Novagard (lisozima) e Tween 20 (0,1%), que produziu uma redução de 16,7% no valor D<sub>60C</sub> para o *Lactobacillus fermentum*, escolhido como alvo pela comparação entre os valores D obtidos, devido ao fato de o *Leuconostoc mesenteroides*, embora sendo o mais resistente, não ser um contaminante importante das dornas de fermentação alcoólica, pela sua baixa tolerância ao

álcool (KAJI, 1989). O coeficiente de temperatura de destruição térmica, Z, encontrado para *Lactobacillus fermentum* foi 7,7°C. Ainda de acordo com Franchi, Serra e Cristianini (2003) a combinação de 10 ppm de nisina, 30 ppm de lisozima e 0,1% de Tween 20 causaram um aumento de 12 h na fase de adaptação dos *Lactobacillus*.

Casadei et al. (2001) avaliaram o efeito do pH e do etanol sobre a resistência térmica para *L. delbueckii* e esporos de *B. cereus*. Para *B. cereus* a queda no pH de 7 para 3 na ausência de etanol causou uma redução média de sete vezes no valor D, enquanto que em concentração de etanol de 10% a redução média foi de 12 vezes. O valor D encontrado para a inativação de *L. delbueckii* a 60°C na ausência de etanol em pH= 7 e a 54°C em pH=3 foram 2.4 e 0.9 minutos, respectivamente.

Os Parâmetros cinéticos de destruição térmica, z do modelo de Bigelow, e a energia de ativação do modelo de Arrhenius,  $E_a$ , podem ser encontrados na Tabela-2, para a sacarose e açúcares redutores totais a 110°C-140°C, e para os esporos de *G. stearothermophilus* a 98°C – 130°C, em mosto à base de caldo de cana e melaço, pH 6,4 e 21,5 Brix.

**Tabela 2. Parâmetros cinéticos de destruição térmica em mosto à base de caldo de cana e melaço (pH 6,4, 21,5Brix).**

<b>Parâmetro cinético</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Frutose</b>	<b>Esporos de <i>G. stearothermophilus</i></b>
$E_a$ (KJ/mol) (Arrhenius)	112,32	140,23	140,37	249,52
Z (°C) (Bigelow)	26,99	21,61	21,59	11,48

FONTE: (NOLASCO JUNIOR, 2005; NOLASCO JUNIOR; DE MASSAGUER, 2006; NOLASCO JUNIOR; DE MASSAGUER, 2007).

Baseado em tais estudos cinéticos, foi avaliado o efeito letal do processo de decantação do caldo sobre a microflora contaminante e sobre os açúcares no mosto, instalando em posições específicas dentro de decantadores industriais, sensores de temperatura por resistência (PT100, 3 fios, classe 1/10 DIN) afim de determinar a distribuição interna de temperatura e identificar o ponto mais frio nesses equipamentos. Em termos de número de reduções decimais, teoricamente, a decantação a temperaturas na faixa de 93-95°C e tempos de aproximadamente 1,15-2,5 horas causaria reduções de  $4,6 \times 10^6$  ciclos logarítmicos sobre o *Lactobacillus fermentum*, considerando os parâmetros cinéticos reportados por Franchi et. al (2003), enquanto que para os esporos de *G. stearothermophilus* a redução estimada, utilizando os parâmetros da Tabela-2, seria de apenas 0,17 ciclos logarítmicos, sendo, portanto, deficiente. Isto porque, para os esporos mesofílicos e termofílicos, o binômio tempo-temperatura do processo de decantação representa um processo subletal de ativação (PFLUG, 1990; ICIEK; PAPIEWSKA; MOLSKA, 2006). Portanto, tratamentos da ordem de 100°C ativam e germinam os esporos, ainda que essa germinação poderia ocorrer durante o processo de fermentação, sendo necessário estabelecer então, um tratamento em condições de tempo x temperatura bem mais rigorosas para atingir as formas esporuladas dos contaminantes. Quanto aos açúcares do mosto, durante a decantação teoricamente e baseado nos parâmetros cinéticos da Tabela-2, a preservação da sacarose sem sofrer hidrólise seria superior a 98% enquanto que a preservação dos açúcares redutores totais (ART) seria superior a 99%. Apesar da potencial letalidade do processo de decantação, a realidade atual das usinas é muito diferente e o processo de recontaminação se inicia já à saída do decantador

chegando a níveis extremamente elevados à fermentação, da ordem de  $10^6$ UFC/ml de bactérias, tipicamente.

Todas as pesquisas citadas acima buscam alternativas ao uso intensivo de antibiótico para controle de contaminantes na fermentação através da esterilização térmica de mostos, com a vantagem de não gerar resíduos tóxicos para o meio ambiente, que, no caso dos antibióticos por sua natureza termorresistente, acabariam se incorporando à vinhaça e ao solo pela fertirrigação, uma prática comum, mas que gera controvérsia. A vinhaça é o principal resíduo da produção de bioetanol e sua aplicação no solo é matéria controversa (DE SOUSA, 2005; FRANCO; MARQUES; DE MELO, 2008; SÃO PAULO, 1995; GUNKEL et al., 2007). A controvérsia é restrita ao potencial risco de salinização dos solos e contaminação do lençol freático. O efeito tóxico do uso intensivo de antibióticos no ambiente não tem sido avaliado até o momento. O único trabalho que mostra o efeito desse uso intensivo de antibióticos é o trabalho de Lima, Grisi e Bonato (1999) descrito no item 3.3.

### **2.3. Tratamentos de controle de contaminantes propostos e resultados**

O bioetanol combustível produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto de cana-de-açúcar, cujas principais características são, alta densidade celular, curto tempo de processo (< 8 horas) e reciclo das leveduras com tratamento ácido<sup>2</sup>, de acordo com o processo de Melle-Boinot (patentes nº 746778/770666) de 1933 (MARILLER, 1951). Outra importante característica dos projetos de fermentação em escala industrial é que são abertos,

---

<sup>2</sup> GONZALES, C.A.; ROSSELL, C.E.V. **Processos de fabricação de açúcar e álcool**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1986. 10p.(RT-207-85/86).

não contidos de fora para dentro ou de dentro para fora e os equipamentos e o processo não seguem critérios sanitários adequados. Essa última característica é decorrente da necessidade de se ter um processo de baixo custo e também das características do biocatalizador, as leveduras do gênero *Saccharomices*, que admitem trabalhar em cultura mista competindo pelo subestrato. Como consequência direta dessas características, as instalações existentes não são seletivas ao micro-organismo responsável pelo processo de fermentação. Em outras palavras, admite uma grande biodiversidade, em competindo pelos substratos e causando prejuízos conforme apresentado anteriormente, potencializado pela prática do reciclo de células que acumula agrava o problema a cada ciclo (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). Além disso, é importante citar que o controle da contaminação bacteriana no processo industrial é baseado totalmente em estratégias corretivas, tais como o uso de produtos químicos e antibióticos, após o estabelecimento de problemas operacionais, sendo que os custos dessa estratégia de gerenciamento ainda devem ser apurados.

Diversos autores têm avaliado o desempenho de desinfetantes químicos, antibióticos na fermentação e biocidas na moenda, como forma de controlar e minimizar as perdas decorrentes da contaminação bacteriana no Brasil e no exterior. No Brasil entre os produtos antibióticos comerciais usados podem ser citados, penicilina, penicilina V potássica®, penicilina V ácida®, clindamicina®, virginiamicina, tetraciclina, biopen 450®, que tem penicilina como princípio ativo, kamoran WP® e kamoran HJ®, cujos princípios ativos são a monensina. Nos Estados Unidos da América, os antibióticos penicilina e virginiamicina também são usados no controle de contaminantes nas fermentações de milho para produção

de etanol combustível (HYNES et al.,1997; BAYROCK; THOMAS; INGLEDEW, 2003; BISHOFF; SKINNER-NEMEC; LEATHERS, 2007; SCHELL et al., 2007). Entre os produtos químicos para controle de bactérias utilizados no Brasil podem-se citar o desinfetante Bactol Q® cujo principio ativo é cloreto de alquil dimetil benzil amonio e Adesol A-207® (BRAZZACH, 1970; ALCARDE; GALLO; OLIVEIRA, 1996; STROPPIA et al.,1998; STROPPIA et al., 2000; OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001).

Oliva-Neto e Yokoya (2001) avaliaram a característica biocida de diversos produtos químicos e concluíram que sulfito, nitrito e sulfato de cobre, foram os mais efetivos. Metilditiocarbamato foi eficiente apenas para *L. fermentum* (CMI= 2,5 µg/ml) e *S. cerevisiae* (CMI= 5,0 µg/ml). Tiocianato, bromofenato e n-alquildimetilbenzil cloreto de amônio afetaram o crescimento de *S. cerevisiae* em concentrações inibitórias similares à *L. mesenteroides* e *L. fermentum*. Formaldeído foi mais efetivo contra as bactérias que contra as leveduras em dois pHs avaliados (4,5 e 6,0). Quatro anos antes, em laboratório, o uso de sulfito em concentrações entre 100-400 mg/l misturado com peróxido de hidrogênio em concentrações 1-10 mMolar foram efetivos para o controle de lactobacilos mesmo em fermentação contínua com reciclo de células (CHANG; KIM; SHIN, 1997). Com o objetivo de combinar efeito bactericida com nutricional para as leveduras, Narendranath; Thomas e Ingledew (2000) sugeriram o uso do composto uréia-peróxido de hidrogênio para controle de lactobacilos contaminantes em fermentações com a vantagem de que esse composto fornece adicionalmente o nitrogênio assimilável e oxigênio contribuindo para um melhor desempenho das



leveduras. Não há registros de testes em escala industrial dessa proposta. Em 1986, meta-bissulfito de potássio a 0.25% foi usado com sucesso no controle de contaminantes bacterianos de fermentação de talos de beterraba para álcool combustível (GIBBONS; WESTBY, 1986). Ruckle (2005) sugeriu que ácidos extraídos de lúpulo são efetivos contra lactobacilos e que em concentrações inibitórias reprime a produção de ácido láctico e ácido acético resultando em fermentações mais eficientes.

Em consonância com o trabalho de Basilio et al. (2008), Elsztein, de Menezes e de Moraes Jr (2008) constataram que nas unidades produtoras de bioetanol da região nordeste do Brasil, os processos de fermentação são conduzidos com a presença de contaminantes bacterianos e leveduras selvagens, que chegam a representar mais de 30% da biomassa total da fermentação. Segundo os autores, a contaminação bacteriana é bem controlada através de pH e uso de antibióticos, enquanto que a contaminação por leveduras selvagens não é controlada por falta de produtos específicos que não sejam prejudiciais à *S. cerevisiae*. Os autores mostraram que o fungicida polihexametil biguanide (PHMB), um desinfetante comumente usado em hospitais, com grande espectro de ação contra bactérias Gram negativas, Gram positivas, fungos e protozoários, foi eficiente contra a maior parte das leveduras selvagens, sem afetar a viabilidade e capacidade fermentativa de *S. cerevisiae*. Dessa forma, foi sugerido o desenvolvimento de uma estratégia de controle de contaminantes específico para leveduras selvagens baseado no uso do produto fungicida polihexametil biguanide (PHMB) a fim de conduzir o processo de fermentação em rendimento alto.

Nos anos 1980, foi usado o pentaclorofenol, “pó da china” como biocida, porém, foi proibido pela agressividade e toxicidade às pessoas e ao meio ambiente<sup>3</sup>.

Alguns trabalhos baseados em estratégias de controle de contaminantes sem uso contínuo de produtos químicos ou antibióticos foram selecionados. Essas estratégias são todas preventivas porque procuram minimizar o problema em suas causas e não em conseqüências.

Alcarde; Walder e Horii (2003) avaliaram que radiação ionizante gama foi eficiente na redução da carga microbiana de mostos de cana-de-açúcar e conferiram aumentos de rendimento na fermentação de 1.9%.

O lactato produzido por bactérias lácticas tem sido descrito como forte inibidor do metabolismo de levedura, diminuindo a eficiência na produção de etanol. Embora bactérias lácticas produzam lactato, estequiometricamente, a partir de açúcares, em geral a capacidade de linhagens de *Lactobacillus* de crescer em meios de cultura contendo elevados níveis de lactato é fortemente inibida, pois os *Lactobacillus* também apresentam inibição pelo produto. Entretanto, níveis elevados de lactato também inibem fortemente o crescimento de *S. cerevisiae* pela acidez e pH (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1997; NARENDRANATH et al., 1997; NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007). Watanabe, Nakamura e Shima (2008) selecionaram leveduras tolerantes ao lactato e encontraram a linhagem, *Candida glabrata* NFRI 3164, que exibiu altos níveis de tolerância ao lactato e capacidade fermentativa. Baseado nos resultados da pesquisa os autores sugeriram a

---

<sup>3</sup> NOTA DO AUTOR.

possibilidade de que o processo de produção de bioetanol combustível fosse projetado para ser conduzido sem a presença de *Lactobacillus sp* através do uso combinado de lactato e *Candida glabrata* NFRI 3164. Trata-se também de uma estratégia baseada no uso contínuo de produtos cuja viabilidade precisa ser avaliada.

Nolasco Junior e Finguerut<sup>4</sup> desenvolveram e testaram em unidades industriais um modelo preditivo para contaminação cíclica característica de fermentações alcoólicas para a fase de crescimento dos contaminantes. O modelo era baseado nos seguintes parâmetros operacionais: concentração de contaminantes no mosto, taxa de rejeição de contaminantes nas centrifugas e concentração de contaminantes na água de diluição do mosto. O modelo se ajustou com sucesso aos dados de acúmulo de contaminantes em fermentações industriais. Baseado nisso foi sugerido a possibilidade de controle mecânico da contaminação em fermentações alcoólicas, através de dupla centrifugação, sem uso de desinfetantes químicos ou antibióticos. Além disso, foi demonstrado o efeito negativo da presença de sólidos insolúveis no mosto para todas as estratégias de controle de contaminantes. Como consequência, a padronização físico-química e microbiológica de mostos de fermentação foi cogitada como condição necessária para controle dos contaminantes da fermentação.

Nessa direção, Nolasco Junior (2005) elaborou um processo térmico obtido graficamente considerando a cinética de destruição de *G. stearothermophilus* em mosto e a retenção de açúcares sob duas condições: uma mais branda que

---

<sup>4</sup> NOLASCO JUNIOR, J.; FINGUERUT, J. **Balanco de bactérias na fermentação contínua**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1996. 22p. (RT-764-95/96).

preservava a sacarose do mosto sem hidrolisá-la (98,7%) e outra mais severa que admitia um certo grau de hidrólise térmica da sacarose, mas preservava os monossacarídeos produzidos (98,7%), Figura-1. O limite inferior foi uma reta de destruição térmica, representando condições de tempo x temperatura, que causariam cinco (5) reduções logarítmicas nos esporos de *G. stearothermophilus*, micro-organismo alvo, sendo que cada uma das condições delimitantes foi determinada através de estudos cinéticos de destruição térmica de cada uma das espécies envolvidas (NOLASCO JUNIOR; DE MASSAGUER, 2006; NOLASCO JUNIOR; DE MASSAGUER, 2007). Graficamente, a intersecção das cinéticas de destruição térmica definiu uma região relativamente ampla de tratamento térmico (tempo x temperatura) que garantiria os níveis de preservação dos açúcares e de destruição do micro-organismo alvo acomodando as muitas diferenças e particularidades encontradas nas Usinas, sem prejudicar o objetivo do processo. Teoricamente os processos térmicos desta zona de otimização seriam capazes de causar  $10^8$  reduções logarítmicas sobre os lactobacilos, considerando os parâmetros de resistência térmica reportados na literatura (FRANCHI et al., 2003).

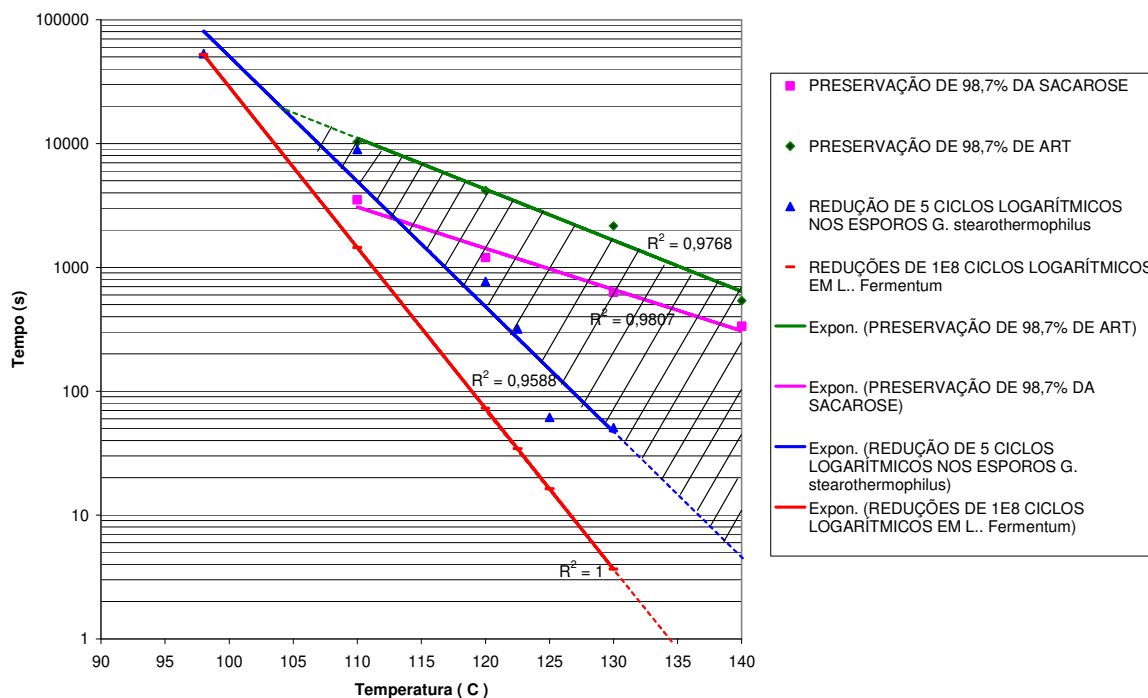


Figura 1. ZONA DE PROCESSO TÉRMICO GRÁFICO OTIMIZADO PARA MOSTOS DE CALDO DE CANA E MELAÇO (21.5BRX, PH=6.4).

Fonte: (NOLASCO JUNIOR, 2005; NOLASCO JUNIOR; DE MASSAGUER, 2006; NOLASCO JUNIOR; DE MASSAGUER, 2007).

É comum confundir aquecimentos praticados durante o processamento da cana-de-açúcar com outras finalidades com tratamentos térmicos otimizados, projetados sob os fundamentos da Termobacteriologia, como é o processo desenhado por NOLASCO JUNIOR (2005). Um exemplo disso é o aquecimento do caldo a aproximadamente 105°C, com a finalidade de acelerar e facilitar a coagulação e floculação de colóides e não-açúcares protéicos, emulsificar graxas e ceras, ou seja, aumentar a eficiência da decantação, além de facilitar a degasagem do caldo (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1988; MADSEN et al.,1998). Como a temperatura é aproximada e não há menção de

tempo de aquecimento nem de processo controlado, este aquecimento não pode ser considerado um tratamento térmico de pasteurização.

Sabendo que a decantação do caldo é realizada em equipamentos denominados clarificadores ou decantadores e que as impurezas sedimentadas constituem o lodo que é retirado do decantador pelo fundo e enviado ao setor de filtração para recuperação do açúcar nele contido, este tipo de tratamento não tem a finalidade de reduzir a flora competitiva formada por bacilos esporulados que sobrevivem nas temperaturas praticadas; tratando-se essencialmente do processo utilizado na clarificação do caldo de cana em todas as usinas brasileiras. Pizaia; Oliveira e Rossell (1986), visando ainda apenas a clarificação do caldo, propuseram um sistema de aquecimento por contato direto e resfriamento evaporativo com vantagens em redução no consumo de vapor, com baixo custo de instalação e manutenção quando comparado com o processo tradicional, por contato indireto através do uso de trocadores de calor. Novamente aqui o objetivo principal do aquecimento do caldo é a decantação como uma variação do processo tradicional a fim de obter as vantagens citadas. Apesar de reconhecida a necessidade de pasteurização do caldo para produção de álcool, como pode ser verificado nas sugestões de Centro de Tecnologia Copersucar (1988) e Madsen et al. (1998), no processo industrial, o caldo para produção de álcool não é nem pasteurizado nem tratado devidamente para remoção de impurezas (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR, 1983; FINGUERUT; LUCREDI; ROSSELL, 1983; LUCREDI et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1987).

Outros trabalhos são encontrados ressaltando que o aquecimento do caldo durante seu tratamento produz reduções significativas na carga de micro-

organismos contaminantes, como é o caso do trabalho de Oliveira (1986), que comparou o resultado do processo de clarificação simples do caldo representado por correção do pH a 6 com leite de CaO a 10°Be seguido de aquecimento a 100°C por 5-60 minutos, com um processo apenas de tratamento térmico na mesma condição. A conclusão do autor é que os dois processos com e sem correção de pH produzem o mesmo resultado em termos de redução da população microbiana e não interferem no processo de fermentação. Na mesma linha de raciocínio, Marques; Machado e Oliveira (1990) enfatizaram o efeito benéfico do aquecimento durante a etapa de tratamento de caldo em laboratório. No trabalho desses autores, caldo de cana filtrado em algodão foi aquecido a temperaturas de 30, 50, 70, 90°C em banho-maria e 100°C por fervura direta, sem mencionar tempos de aquecimento, e submetidos a ensaios de fermentação. Os autores concluíram que o aquecimento do caldo deve ser encarado também como uma maneira de se controlar a contaminação microbiológica durante a fermentação, visto que a carga de bactérias no vinho foi o único fator microbiológico afetado significativamente com o aumento da temperatura de tratamento do caldo sugerindo o uso de esterilização comercial do caldo de cana a exemplo do que ocorre em outras indústrias como a de laticínios, para que tais micro-organismos não venham interferir negativamente no processo fermentativo. Na prática essa sugestão ainda não foi adotada. Em outro trabalho, Marques e Machado (1990) aqueceram caldo filtrado em algodão a temperaturas de 30, 50, 70 e 90°C em banho-maria e 100°C por fervura direta por 2 horas, completaram o volume dos frascos com água destilada e submeteram a testes de fermentação a 30°C. Os autores não detectaram alterações nos açúcares redutores totais (ART),

pH, acidez sulfúrica e tampouco efeitos positivos ou negativos sobre a atividade da levedura, mas indicaram que para a produção de açúcar, o “tratamento térmico” pode causar decréscimos no teor de sacarose e redução na eficiência global de fabricação.

A pesquisa de Nolasco Junior (2005) forneceu duas condições limites: uma mais branda com preservação da sacarose e outra mais rigorosa com preservação do ART, em ambos os casos o tratamento térmico foi otimizado para preservação de 98,7% dos açúcares, dentro da margem de erro da metodologia usada para determinação dos açúcares, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em termos de tratamento térmico com finalidade de preservação microbiológica, pode-se citar Samorano e Faria (2006) em caldo de cana para bebida. Os autores compararam processamento asséptico com tratamento térmico representado pelo binômio 141°C/10s e envase a 25°C, com tratamento térmico representado pelo binômio 110°C/10s com envase a 90°C em garrafas de vidro submetidas a resfriamento a 40 °C por imersão em água clorada, 5 ppm, e concluíram que o envase a quente se mostrou mais adequado tanto em termos sensoriais quanto em termos de alterações físico-químicas e com a vantagem de ser um processo mais simples e acessível a pequenos produtores. Esses autores não especificaram a forma como foi obtido o binômio de temperatura e tempo utilizado, nem qual era o micro-organismo alvo.

Os trabalhos citados anteriormente sem dúvida causaram alguma redução na concentração inicial de contaminantes, mas não mencionaram o micro-organismo alvo, fatores nutricionais a serem preservados ou estudos cinéticos de destruição térmica das espécies envolvidas necessários para definição de



processos térmicos. Por outro lado, o trabalho de Nolasco Junior (2005) foi totalmente baseado em estudos cinéticos das espécies envolvidas o que permitiu a determinação da zona de processo térmico, otimizada para máximo rendimento global, formada por binômios de temperatura e tempo, delimitada por curvas de tempo e temperatura de destruição térmica (TDT) para causar redução de 5 ciclos logarítmicos no micro-organismo alvo, *G. stearothermophilus*, e preservação de 98,7% dos açúcares sacarose e ART do mosto. Essa é a base do princípio da alta temperatura – curto tempo de processamento. Para a termobacteriologia, isto é apenas questão de otimização (PFLUG, 1990).

Foram encontrados alguns trabalhos realizados na década de 1970 sobre esterilização de melaço em altas concentrações de sólidos dissolvidos e longos tempos de tratamento. Esses trabalhos avaliaram os impactos da esterilização nas propriedades tecnológicas (sólidos totais dissolvidos, concentração de sacarose e açúcares redutores, pH, etc) e microbiológicas e na degradação de açúcares. Processos térmicos com binômios 110C/30min, 120C/15min, 130C/10min e 140C/5min foram efetivos para suprimir totalmente a microflora contaminante, mas diluição para 50-60% de sólidos dissolvidos foi recomendada para melhorar a efetividade do processo térmico na preservação das propriedades tecnológicas do melaço e minimizar a formação de melanoidinas (SHVETS; SLYUSARENKO; PATSERA, 1972; SLYUSARENKO; SHVETS; KNOGOTKOVA, 1972). Shvets (1976) verificou que a constante cinética de inversão da sacarose não dependia da concentração do melaço sendo mínima em pH na faixa de 6,8-8,5.

## 2.4. Otimização de processos térmicos

Kwok; Liang e Niranjana (2002) ajustaram modelos matemáticos e cinéticos, obtidos em batelada com tubos capilares, para as mudanças na qualidade induzidas pelo calor incluindo atividade inibidora de tripsina (AIT), degradação de tiamina, riboflavina, cor e aroma e para esporos de *Clostridium sporogenes* em uma grande faixa de condições de tempo e temperatura, mas com interesse na faixa de ultra-alta temperatura. Um processo otimizado graficamente por curvas TDT das espécies de interesse foi realizado e validado nas temperaturas de 139°C, 145°C e 154°C com excelente ajuste dos dados obtidos experimentalmente e os preditos pelos modelos matemáticos. A 143°C/60s foi possível produzir um leite de soja comercialmente estéril com inativação de AIT satisfatória, superior a 90%, cor e aroma altamente aceitáveis e com retenção de tiamina entre 90-93%. De forma similar, Claeys et al. (2004) apresentaram o conceito dos integradores de tempo e temperatura para avaliação do tratamento térmico a que foi submetido o leite sem conhecer a história térmica do processo. Os autores estudaram seis (6) compostos como potenciais integradores de tempo e temperatura para o leite: as enzimas alcalina fosfatase e lactoperoxidase, a proteína  $\beta$ -lactoglobulina e os compostos químicos hidroximetilfurfural, lactulose e furosina. A partir de estudos cinéticos de formação ou destruição desses produtos e destruição térmica do micro-organismo alvo, foram traçados diagramas gerais de tempo e temperatura de tolerância. Esses diagramas são muito informativos já que permitem visualização do impacto do processo térmico sobre o leite e avaliação do critério utilizado para confirmar sua autenticidade de acordo com a terminologia aplicada.

Além do mais, a combinação ótima da temperatura e tempo de aquecimento pode ser rapidamente deduzida a partir desses diagramas.

Ghani et al. (2001) utilizaram um procedimento de dinâmica computacional de fluidos incluindo cinéticas de degradação bioquímica de ácido ascórbico, tiamina e riboflavina e de destruição térmica de *Clostridium botulinum* para prever a zona de aquecimento mais lenta em processos de esterilização de latas contendo suco de cerejas a 74Brix a diferentes temperaturas. Nesse trabalho foi possível demonstrar a migração da zona de aquecimento mais lenta da seção transversal da lata no início do aquecimento para o fundo no final do processo, bem como, a dependência das concentrações remanescentes de bactéria e vitaminas frente ao perfil da temperatura e fluxo.

Considerando que o principal objetivo de projeto de um processo térmico contínuo é a garantia de um tempo de residência mínimo de retenção, a otimização de processo requer o conhecimento da distribuição dos tempos de residência. Nesse sentido Torres e Oliveira (1998) propuseram a determinação experimental da distribuição dos tempos de residência através do uso de traçadores, já que os modelos teóricos fornecem valores conservativos e consequentemente sobreprocessamento de produtos.

Revisando processos térmicos e qualidade dos produtos, Awuah; Ramaswamy e Economides (2007) destacaram o processamento asséptico UHT/HTST pela história de sucesso desse tipo de tratamento para alimentos líquidos e alimentos líquidos contendo sólidos particulados. Entre as vantagens citadas estão maior retenção de fatores de qualidade e maior eficiência energética devido às taxas de transferência de calor elevadas. Os autores relataram que

devido a complicações associadas ao efeito da temperatura na viscosidade do produto e na distribuição dos tempos de residência, o FDA, no passado, reconhecia apenas a letalidade no tubo de retenção considerando as letalidades do aquecimento e resfriamento como fatores de segurança. Segundo os mesmos autores, mais recentemente o FDA iria aceitar a letalidade integral do processo contanto que dados apropriados fossem apresentados para dar suporte a qualquer reclamação. Continuando, Awuah; Ramaswamy e Economides (2007) destacaram o considerável esforço que vem sendo desenvolvido para estender o processo asséptico a produtos contendo partículas maiores. As maiores preocupações com produtos contendo partículas grandes incluem a complexidade da distribuição dos tempos de residência e da transferência de calor e ponto mais frio para o sistema com partículas em movimento. Diante dessa complexidade, os autores citaram novas tecnologias que estão previstas para ajudar a resolver parte dos problemas como validação global do processo usando marcadores microbiológicos, marcadores químicos como enzimas ou outros indicadores apropriadamente calibrados em termos de tempo e temperatura.

## **2.5. Riscos associados ao uso intensivo de antibióticos no controle da contaminação**

Wannmacher (2004), citando dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), relatou que as infecções causam 25% das mortes em todo o mundo e 45%, nos países menos desenvolvidos. Estimativas indicavam que somente nos Estados Unidos, havia 160 milhões de prescrições de antibióticos (30 prescrições/100 pessoas/ano), correspondendo a 25 mil toneladas de antibióticos, dos quais cerca de 50% destinavam-se a pacientes sendo o restante usado em

animais, agricultura e aquacultura. O desenvolvimento de resistência é fenômeno biológico natural que se seguiu à introdução de agentes antimicrobianos na prática clínica. O uso desmedido e irracional desses agentes tem contribuído para o aumento do problema. A chamada pressão antibiótica, referente à relação entre extensão de uso de antibióticos e seleção de cepas resistentes, é assunto polêmico, mas o uso contínuo de antimicrobianos tem aumentado a resistência de várias bactérias a antimicrobianos comuns. A contenção da resistência será alcançada mediante o uso racional de antimicrobianos em medicina humana e uso não humano.

Durante a Conferência Européia sobre Uso de Antimicrobianos, em 2001, foi enfatizado que o problema da resistência microbiana não iria ser contornado pelo contínuo desenvolvimento de novos fármacos, mas pela urgente preocupação com a imediata redução do uso desnecessário e, muitas vezes, inapropriado dos antibióticos (WANNMACHER, 2004). De Freitas (1989) avaliou que se por um lado, o Homem isola ou sintetiza novos antibióticos, pelo outro, as bactérias ampliam, a todo instante, o seu arsenal de defesas, recorrendo aos mecanismos que possibilitam a neutralização dos efeitos (inibitório, bacteriostático, bactericida e bacteriolítico) dessas drogas. De acordo com o autor, esses mecanismos vão desde a alteração da permeabilidade da parede e/ou das membranas, passando pela produção de enzimas inativadoras dos antibióticos, até a modificação dos seus sítios de ação, sendo que as bactérias dispõem, ainda, de plasmídios e transposons, por meio dos quais difundem, entre si, a competência genético-bioquímica que lhes confere esses mecanismos de defesa. Nesse mesmo artigo, o autor reportou que à clássica resistência bacteriana aos

antibióticos, caracterizada por valores aumentados das concentrações mínimas inibitórias, CMI, e bactericidas, CMB, em relação aos valores das cepas sensíveis, somou-se, desde o início da década de 70, a tolerância a antibióticos. Na cepa tolerante, a CMI é a mesma da cepa sensível ao passo que a CMB é muito mais alta chegando a  $CMB/CMI \geq 16$ . Do ponto de vista terapêutico, para eliminar a cepa resistente basta alcançar a  $CMI=CMB$ , já a morte da cepa tolerante exigiria pelo menos  $16 \times CMI$ . Assim, o aumento da concentração do antibiótico poderia não ser suficiente para atingir a CMB no sítio da infecção e desencadear os chamados efeitos colaterais dos antibióticos (DE FREITAS, 1989).

Um dos principais usos não humanos de antibióticos é na nutrição animal, como promotores de crescimento, na criação intensiva de animais. Essa prática tem sido apontada como uma das fontes não humanas principais, que sustenta o aparecimento de bactérias nocivas ao Homem, resistentes a antibióticos. O mecanismo de transferência de resistência que essa prática exerce sobre as bactérias nocivas ao Homem é bastante controverso, embora haja clara evidência que o aumento no consumo de antibióticos na veterinária, tem sido acompanhado por um similar aumento no número de linhagens de patógenos humanos resistentes a antibióticos. Estudos com *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococos* e *Campylobacter* sustentam a reivindicação de que novos genes resistentes poderiam ser selecionados na flora bacteriana de animais, como consequência direta do uso de antibióticos (THAL; ZERVOS, 1999; PESSANHA; GONTIJO FILHO, 2001; VAN DEN BOGAARD et al., 2002; LEDERGERBER et al., 2003).

Existem relatos na Europa sobre bactérias resistentes a vancomicina®, uma das drogas de último recurso para tratamento de certas infecções,

possivelmente associado ao uso na agricultura do avoparcina, uma droga quimicamente similar à vancomicina. Nos EUA foi relatado fenômeno similar com o synercid, a droga usada para tratar infecções resistentes a vancomicina possivelmente associado ao uso da virginiamicina, quimicamente relacionada ao synercid, como promotor de crescimento em aves e porcos (UNION OF CONCERNED SCIENTISTS, 2010). A Administração de Drogas e Alimentos Americana (FDA) baniu o uso de uma classe particular de antibióticos chamada fluoroquinolonas na criação de frangos ao passo que, preocupações com bactérias resistentes a antibióticos levaram a União Européia a banir, em 1999, o uso de quatro antibióticos usados como promotores de crescimento em frangos (LEDERGERBER et al., 2003). No âmbito da União Européia, nova regulamentação proibiu totalmente o uso de antibióticos como promotores de crescimento a partir de 2003, inclusive a monensina sódica, a salinomicina sódica, a avilamicina e o flavofosfolipol que não são usados na medicina humana (EUROPA, 2003). Haese e Silva (2004) avaliaram as vantagens e desvantagens do uso de antibióticos como promotores de crescimento na criação intensiva de animais. Segundo os autores, o Brasil está passando por um período de mudanças em relação à legislação sobre o uso de antibióticos, seja na terapêutica seja como promotores de crescimento. Ainda segundo Haese e Silva (2004), o decreto de lei sobre o uso de antibióticos no Brasil foi revogado em 22 de abril de 2004, estando em discussão as novas normas para os mesmos ressaltando que eram liberados para uso, até aquela data, 17 antibióticos como promotores de crescimento e 117 para uso terapêutico.

Conforme visto anteriormente, o problema dos contaminantes na fermentação alcoólica aqui no Brasil e também nos Estados Unidos, os dois maiores produtores de etanol combustível, é enfrentado com o uso intensivo de antibióticos. O consumo de antibióticos médio de 8,7 g/m<sup>3</sup> de etanol produzido na safra 2005/2006<sup>5</sup> aplicado à produção da safra 2008/2009 de 27 bilhões de litros de etanol (JORNALCANA, 2010), representaria um consumo de 234,9 toneladas de antibióticos. Assim observa-se que a produção em larga escala de biocombustíveis estaria baseada no uso intensivo de antibióticos se apresentando como mais um setor a contribuir para a crescente resistência a antibióticos.

A pressão seletiva da antibioticoterapia no setor sucroalcooleiro foi constatada por Lima, Grisi e Bonato (1999) que realizaram um rastreamento num agrossistema de cana-de-açúcar para obtenção de bactérias capazes de sintetizar polihidroxialcanoatos (PHA) e que usassem a sacarose como principal fonte de carbono, além de serem resistentes a antibióticos. De acordo com os autores, oitenta e duas linhagens de bactérias, pertencentes a dezesseis gêneros e trinta e cinco espécies foram isoladas, dentre as quais setenta e três (89%) apresentaram múltipla resistência a antibióticos em dosagens de 10 – 100 U/ml de penicilina e 100 – 300 µg/ml de virginiamicina, antibióticos usados na fermentação das usinas. Para os autores, esse fenômeno de resistência encontrado nessas linhagens estaria ligado à pressão seletiva exercida pela aplicação da vinhaça no solo, no sistema de manejo e cultivo de cana-de-açúcar. Vale ressaltar que, no processo de sangramento e recuperação do fermento para produção de levedura seca, os

---

<sup>5</sup> CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – Controle mútuo agroindustrial safra 2005/06. Piracicaba, 2006.



importadores não aceitam lotes de produto de fermentações alcoólicas com dosagem de antibióticos como Kamoran® e HJ®<sup>6</sup>

Para Wannmacher (2004), no início da década de 40 do século XX, foi iniciada a “era antibiótica”, que parecia destinada a vencer a grande batalha contra as infecções, erradicando doenças e aumentando significativamente a expectativa de vida. Nos primórdios do novo século, esses mesmos antibióticos estão no bojo de uma guerra atual e futura – a da resistência microbiana – que será perdida, a menos que haja conscientização global sobre a gravidade do problema e adoção de sérias estratégias para contê-lo. Para a autora, trata-se de mais um desafio global.

## **2.6. Fertirrigação: efeitos da vinhaça no solo**

A tecnologia de fermentação alcoólica atual, apesar de apresentar um dos mais elevados níveis de produtividade do mundo, também se caracteriza por gerar um volume de vinhaça excessivamente alto (10-15 litros/litro de álcool produzido). Vinhaça é o resíduo da destilação de mostos fermentados e genericamente e dependendo da composição do mosto, se mais ou menos rico em melaço, é um material de alta carga orgânica e de potássio com valores médios de demanda bioquímica e química de oxigênio, DBO e DQO, de 16950 mg/l e 28450 mg/l; respectivamente (DE SOUSA, 2005). No chamado etanol de segunda geração, obtido por hidrólise de materiais lignocelulósicos, o volume de vinhaça gerada poderá ser da ordem de 18 litros para cada litro de etanol produzido porque os

---

<sup>6</sup> NOTA DO AUTOR

caldos hidrolisados tenderão a ter concentrações de açúcares menores que o caldo de cana.

Até 1978 a vinhaça era despejada diretamente nos rios e a partir dessa data passou a ser totalmente aplicada nos canaviais com o objetivo de substituir total ou parcialmente a adubação mineral e evitar a poluição de mananciais superficiais (DE SOUSA, 2005). Entre os benefícios da prática da fertirrigação, nome dado à prática da aplicação da vinhaça no solo pelo fato de disponibilizar ao mesmo tempo água e o nutriente mineral potássio, De Sousa (2005) citou a utilização de solos de baixa fertilidade, melhor produtividade e maior longevidade dos canaviais, além de baixo uso de fertilizantes químicos. Ainda de acordo com o autor, respeitando-se as características dos solos onde é aplicada, a localização das nascentes d'água e os volumes definidos como adequados em cada situação, a vinhaça não provoca efeitos negativos sendo considerada um fertilizante orgânico e liberada também para a produção de açúcar “orgânico”, na qual não podem ser utilizados insumos químicos como herbicidas, inseticidas e adubos minerais. Alguns trabalhos recentes avaliaram e recomendaram o uso de vinhaça e lodo de tratamentos de esgotos, o primeiro como fonte de potássio e último como fonte de nitrogênio, na adubação de cana-de-açúcar em substituição à adubação mineral, conferindo uma importante destinação a esses resíduos (CANELLAS et al., 2003; CO; MARQUES; TASSO, 2008; FRANCO; MARQUES; DE MELO, 2008). De Rezende et al. (2006) avaliaram a aplicação de vinhaça em canavial de Pernambuco na região nordeste brasileira durante 16 anos. Os resultados mostraram que nas taxas utilizadas, 80 m<sup>3</sup>/ha, a adição de vinhaça foi claramente benéfica no curto e no longo prazo principalmente devido ao potássio

e redução da acidez do solo e da toxidez do alumínio. Entretanto, os autores alertaram que os solos próximos à destilaria ficaram saturados em potássio enquanto os solos mais distantes necessitavam de adição de potássio mineral.

Devido ao grande volume e custos do manejo desse resíduo, os critérios de aplicação são econômicos e não técnicos. Consequentemente a fertirrigação não é praticada em toda a área de cana colhida. Segundo Demattê et al. (2004), 300m<sup>3</sup>/ha representam doses normais de aplicação de vinhaça. Dados não publicados, obtidos com empresas de implantação de projetos de fertirrigação com vinhaça em usinas, indicam os custos de aplicação da vinhaça no solo de acordo com o processo empregado (Tabela-4). Por esses dados e considerando o valor médio de R\$ 750,00/m<sup>3</sup> do etanol no ano de 2007, o sistema mais barato de aplicação de vinhaça representaria 4,23% do faturamento em álcool de uma unidade produtora. Os custos, para aplicação em toda área de cana colhida, são muito elevados e por isso prevalece o critério econômico de aplicação e distribuição de vinhaça.

**Tabela 4. Custos de aplicação de vinhaça de acordo com o tipo de processo de aplicação. Valores referentes a fevereiro/2007.**

PROCESSO DE APLICAÇÃO	CUSTO R\$/m <sup>3</sup> de vinhaça (base fev/2007).	Observações
Canal + carretel	2,35	-X-
Caminhão + carretel	2,83	Frete 10 km e dosagem de 100 m <sup>3</sup> /ha.
Concentrada (40ºBrix)	69,59	R\$ 67,00/m <sup>3</sup> para concentrar

A prática da fertirrigação é controversa e tem crescido a preocupação com possíveis impactos negativos na qualidade dos solos e das águas subterrâneas. O contexto geológico da região de Ribeirão Preto, principal região produtora de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo com alta porosidade e intenso fraturamento no substrato de basalto e diabásio, não oferece uma zona de retenção confiável de poluentes para o aquífero Botucatu-Pirambóia (SÃO PAULO, 1995). Estudo realizado na área de afloramento do Aquífero Botucatu-Pirambóia, no município de Serrana, região de Ribeirão Preto, indicou que após aplicação de vinhaça, as análises químicas demonstraram que parâmetros como carbono orgânico dissolvido (COD), cloretos, nitrogênio kjendahl total, nitrogênio amoniacal e sulfato, atingiram as águas subterrâneas, causando alterações em seus valores naturais; o potássio e o nitrogênio nítrico não provocaram alterações (GLOEDEN, 1994). Gunkel et al. (2007), após avaliar o impacto da produção de etanol e cana-de-açúcar focado na fertirrigação sobre o rio Ipojuca em Pernambuco, região nordeste brasileira, sugeriu uma reavaliação crítica do programa brasileiro de biocombustíveis na direção de métodos ecologicamente corretos, reduzindo os rejeitos e adotando ciclos. Cruz; Righetto e Nogueira (1991) observaram em área de cultura de cana-de-açúcar, que recebe aplicação de vinhaça de  $300\text{m}^3/\text{ha}/\text{ano}$ , a manutenção da fertilidade do solo, mas com elevação da concentração de nitrato nas águas subterrâneas. Martinelli e Filoso (2008) avaliaram os desafios sociais e ambientais da expansão da agroindústria da cana-de-açúcar para produção de etanol no Brasil. No que diz respeito à vinhaça, os autores ressaltaram que a solução da fertirrigação ajudou a proteger os sistemas aquáticos apenas parcialmente citando estudos que demonstraram

alterações significativas na qualidade da água a 1,8 km abaixo de uma usina de açúcar e álcool.

Tauk (1990) avaliou, durante cinco (5) anos, o efeito de doses cumulativas de vinhaça de 20 l/m<sup>2</sup>/ano e 50 l/m<sup>2</sup>/ano sobre a dinâmica da microbiota do solo do cerrado. Foi observado que a vinhaça alterou a população microbiana no solo. Os fungos mais abundantes em solo de cerrado sem vinhaça foram *Chaetomium*, leveduras, *Mucor*, *Penicillium* e *Trichoderma*, enquanto que em solos tratados com vinhaça os mesmos gêneros foram encontrados com inclusão do fungo *Verticillium* e supressão de leveduras. A atual expansão do setor sucroalcooleiro para outras regiões do país, como a região dos cerrados no centro-oeste do Brasil, por exemplo, encontrará solos com valores extremamente baixos de CTC (capacidade de troca cátions), indicativo de alto grau de intemperização com predominância de argilas de baixa atividade e, portanto, indicativa de grande potencial para lixiviação de cátions (LOPES, 1983).

Foi avaliado o efeito da concentração da vinhaça aplicada a três variedades de cana. O estudo revelou que todas as variedades apresentaram aumento nos sólidos solúveis totais e de acumulação de sacarose quando vinhaça a 25% foi usada (SINGH et. al., 2007). Lelis Neto (2008) avaliou a dinâmica de diferentes componentes químicos presentes na vinhaça em dois diferentes tipos de solo, argiloso e arenoso, submetidos a dosagens de vinhaça de 100, 150, 200, 250 e 300 m<sup>3</sup>/ha e concluiu que a percolação de íons está diretamente relacionada com o tipo de solo e com a concentração de vinhaça e que a movimentação dos íons deve ser estudada em longos períodos para mostrar melhor a sua movimentação no perfil do solo. Em oito meses de aplicação os parâmetros de transporte

evidenciaram positivamente a adsorção e o deslocamento de íons nitrato e potássio presentes na vinhaça sendo que nenhum dos tipos de solo estudados apresentou risco de contaminação do lençol freático por nitrato, mesmo na maior dosagem de 300 m<sup>3</sup>/ha. É consenso entre os agentes do setor que o etanol para se tornar uma “commodity” internacional deverá ser produzido em diversas partes do mundo, entretanto, o resíduo vinhaça é uma limitação para expansão da produção em outras partes do mundo. Estudo realizado na Universidade da Flórida para avaliar a possibilidade de implantação de um sistema integrado de produção de biomassa em energia apontou a necessidade de soluções efetivas para a vinhaça (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000). A Colômbia iniciou em 2001 seu programa nacional de álcool combustível com restrições às tecnologias a serem usadas relativas a baixa produção de vinhaça e gerenciamento de resíduos (BELTRÁN, 2007). Algumas soluções para reduzir o volume de vinhaça têm sido apontadas como a bioconcentração que recicla 60% do volume da vinhaça na fermentação (NAVARRO; SEPÚLVEDA; RUBIO, 2000). O Brasil testou sem sucesso o reciclo de vinhaça na fermentação através do processo Biostil® na década de 80 (LEÃO, 2005).

Além dos impactos ambientais discutidos sobre os riscos existentes para o lençol freático e salinização do solo, é necessário avaliar o efeito ambiental do uso intensivo de antibióticos usados no controle de contaminantes na fermentação, já que por serem termo resistentes, a maior parte do antibiótico utilizado é incorporada ao solo pela prática da fertirrigação. Neste caso a produção de biocombustíveis pode ser mais um dos fatores não humanos a contribuir para o aumento da resistência a antimicrobianos que a medicina vem enfrentando. O

único trabalho que avaliou este fato até o momento é o trabalho de Lima, Grisi e Bonato (1999).

## **2.7 A Evolução tecnológica na produção de bioetanol no Brasil**

Em outubro de 1975 foi anunciado, pelo governo federal, o Programa Nacional do Álcool, Proálcool, como forma de enfrentar a crise gerada pelo choque do petróleo ocorrido entre 1970 e 1973, que teve seu preço aumentado em 100% em poucas semanas causando grandes problemas na balança de pagamentos do Brasil, na época, muito dependente do petróleo importado (LIMA; MARCONDES, 2002). De acordo com Ometto (1998), o balanço de 20 anos de existência do Proálcool foi positivo, pois propiciou considerável desenvolvimento tecnológico, expandiu o desempenho da economia e evitou, pelo menos parcialmente, o agravamento da questão ambiental. Ainda segundo o autor, desde a sua criação, o Proálcool representou investimentos de US\$ 11 bilhões e obteve economia de divisas de US\$ 27 bilhões, substituindo parte das importações de petróleo. A partir do Proálcool, houve demanda por processos mais eficientes e avanços tecnológicos se acentuaram na cadeia produtiva da agricultura e da indústria sucroalcooleira. O antigo processo de fermentação tipo batelada com longos tempos de processo de 24-30h e baixo rendimento, com cortes para formação de inóculo para novos ciclos de fermentação (AMORIM, 2005), foi substituído pelo processo de Melle-Boinot<sup>7</sup> (MARILLER, 1951). O processo de Melle-Boinot, patente nº 770.666 de 1933, compreendia reciclo de fermento para saturação e redução da produção de biomassa por 5-10 ciclos e nova propagação

---

<sup>7</sup> GONZALES, C.A.; ROSSELL, C.E.V. **Processos de fabricação de açúcar e álcool**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1986. 10p. (RT-207-85/86).

e tratamento com ácido sulfúrico pH 2,6-2,8 (MARILLER, 1951). A patente nº 746078, também de Melle-Boinot, descrevia o processo de reciclo de fermento através de centrifugas e reivindicava rendimento de 65 litros de etanol/100 Kg de sacarose, maior controle de contaminantes por serem lavados do processo pela centrífuga e viabilidade celular de 80-85% (MARILLER, 1951).

A fermentação batelada pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, pois substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (DE CARVALHO; SATO, 2001). De acordo com Maiorella; Wilke e Blanch (1981), a inibição às leveduras se torna mais pronunciada em concentrações de açúcares acima de 150 g/l. As respostas metabólicas de leveduras a choque osmótico são conhecidas: perda de água intracelular, produção de glicerol como agente osmorregulador, acúmulo de trealose e inibição do crescimento celular como forma de adaptação a essa condição e também por inibição pelo produto formado, o etanol (HOHMANN, 2002; HOHMANN; KRANTZ; NORDLANDER, 2007; DEVANTIER et al., 2005). Segundo alguns autores, o efeito inibitório do etanol na taxa de crescimento celular começa a partir de concentrações de 15 g/l com inibição total sendo reportada a 110 a 115 g/l (MAIORELLA; WILKE; BLANCH, 1981; LUONG, 1985).

O estudo da cinética de processos microbianos tem por objetivo básico quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados e os modelos cinéticos normalmente usados para descrever a fermentação alcoólica são os não-estruturados e não segregados, nos quais as células de micro-organismos são consideradas como



soluto (BAILEY; OLLIS, 1986; ANDRIETTA, 1994; VIEGAS, 2003). A equação mais simples que representa o fenômeno do crescimento é a equação de Monod (Eq. 1) que é válida para sistemas sem efeitos inibitórios significativos, ou seja, para baixas concentrações de etanol e de biomassa no meio.

$$\mu = \mu_{\max} \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

Os vários modelos cinéticos e parâmetros ajustados podem ser encontrados na literatura (ATALA, 2000; TOSETTO, 2002). Um exemplo de modelo cinético não estruturado e não segregado é o modelo de Tosetto (2002), Eq. 2, que apresenta termos de inibição pelo substrato e pelo produto cujos parâmetros cinéticos ajustados pelo autor em experimentos realizados para essa finalidade podem ser encontrados na Tabela-5.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_i}{\left( S_i + K_s + \frac{S_i^2}{K_i} \right)} \left( 1 - \frac{P_i}{P_{\max}} \right)^{Y_N} \quad \text{Eq.2}$$

Tabela-5. **Parâmetros cinéticos do modelo de Tosetto (2002).**

K <sub>s</sub> (g/l)	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	P <sub>max</sub> (g/l)	Y <sub>N</sub>	K <sub>i</sub> (g/l)
21	0,5	88	0,7	15,5

. **Fonte: TOSETTO (2002).**

Os processos contínuos e batelada alimentada dominam a tecnologia de fermentação na produção de bioetanol no Brasil e são projetados para operarem fora das condições inibidoras de substrato ou de produto (ANDRIETTA, 1994, AMORIM, 2005). Andrietta (1994) citou como vantagens dos processos

fermentativos contínuos a maior produtividade, maior uniformidade do produto e maior adaptabilidade ao controle automático.

Apesar dos avanços em modelagem a realidade dos processos industriais de fermentação era bem diferente. O tratamento do caldo para fermentação era deficiente e enviava grandes quantidades de sólidos ao processo que, devido às suas características granulométricas, a maior parte, 60%, era reciclada e acumulava nos fermentadores disponibilizando alguns milhares de metros quadrados de superfície, rica em macro e micro nutrientes inclusive açúcares residuais, que se transformava num habitat para o desenvolvimento de contaminantes que nem mesmo o uso de antibióticos conseguia eliminar<sup>8</sup>. Outra característica do processo de fermentação é que são abertos, não contidos de fora para dentro ou de dentro para fora, e uma grande biodiversidade pode ser encontrada no interior dos fermentadores como visto anteriormente. Para Nolasco Junior e Finguerut<sup>9</sup>, o mosto pode ser responsabilizado pela biodiversidade encontrada na fermentação, pois inocula continuamente uma carga elevada de bactérias no processo de fermentação que é reciclada quase totalmente durante o reciclo de fermento, que recicla 95% do fermento e 70% das bactérias, como pode ser visto na Figura-2. Os autores avaliaram que uma vez inoculada na fermentação, qualquer que seja a quantidade de contaminantes, todas as espécies que compõe a biodiversidade serão estimuladas a se reproduzir

---

<sup>8</sup> CHRISTOFOLETTI, A.J.; NOLASCO JUNIOR, J.; FINGUERUT, J. **Tratamento de caldo e incrustação no processo de esterilização de mosto**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1998. 22p. (RT-827-97/98).

<sup>9</sup> NOLASCO JUNIOR, J.; FINGUERUT, J. **Balanço de bactérias na fermentação contínua**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1996. 22p. (RT-764-95/96).

pela oferta de substrato, mas também serão inibidas pelos produtos do catabolismo desses mesmos substratos. Para os autores, o modelo cinético de crescimento desses micro-organismos seria necessariamente complexo, por envolver cultura mista de micro-organismos, diversos produtos do catabolismo e ainda as interações entre as diversas espécies.

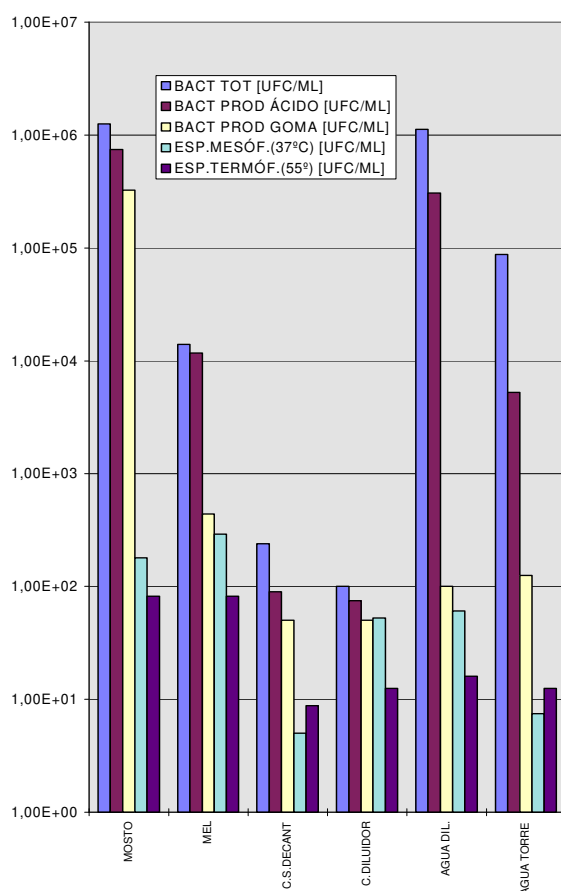


Figura 2. CARGA MICROBIOLÓGICA DO MOSTO E DAS CORRENTES FORMADORAS DO MOSTO EM AMOSTRAGEM NAS USINAS COOPERADAS AO SISTEMA COPERSUCAR DURANTE A SAFRA 1997/1998.

FONTE: (NOLASCO JUNIOR; FINGUERUT<sup>10</sup>).

<sup>10</sup> NOLASCO JUNIOR, J.; FINGUERUT, J. **Esterilização de mosto-Processo CIP/SIP**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1998. 37p. (RT-835-97/98).

Nos anos 1980, a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, foi contratada pelo Centro de Tecnologia Copersucar para desenvolvimento de metodologias para acompanhamento dos processos de extração e fermentação. Nesse trabalho, além das metodologias microbiológicas para acompanhamento do processo, foi avaliada a atividade invertásica das leveduras de processo cujos valores eram extremamente baixos comparados com as leveduras de panificação<sup>11</sup>.

Os processos de fermentação industriais são avaliados pelo rendimento para o qual existem duas metodologias: o rendimento obtido por balanço de massa no volume de controle da fermentação que relaciona a quantidade de álcool efetivamente produzido com aquela que poderia ser estequiometricamente produzida a partir do ART alimentado (FINGUERUT et al., 1984) e o método por subprodutos (FINGUERUT et al., 1985) que mede as produções específicas de outros produtos formados na fermentação em relação ao etanol produzido. Os subprodutos medidos são o glicerol, ácidos, leveduras e açúcar residual não fermentado. Desde Pasteur já se sabia que outros produtos além de CO<sub>2</sub> e etanol eram produzidos durante a fermentação. Essa metodologia foi desenvolvida e aplicada no âmbito do Sistema Copersucar e apresenta a grande vantagem de eliminar a necessidade de medição de vazões de processo para seu cálculo. As bases para o desenvolvimento do rendimento por subprodutos podem ser

---

<sup>11</sup> CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. **Desenvolvimento de metodologia para acompanhamento da extração do caldo de cana e da fermentação.** Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1987. 54p. (RT-335-87/88).

encontradas em Finguerut et. al (1985) e Finguerut e Rossell<sup>12</sup>. Ao longo dos anos os coeficientes foram revisados até chegar à fórmula usada atualmente, Eq.3<sup>13</sup>. O método de cálculo do rendimento por subprodutos tem como principal vantagem, fornecer informações sobre as causas de queda do rendimento, se por excessiva produção de levedura, se por excessiva produção de ácidos associado à contaminação.

$$R_{sp} = \frac{100}{(1.01 + 1.19 * K_{LEVEDURA} + 0.511 * (K_{ARRT} + K_{ÁCIDO} + K_{GLICEROL}))} \quad \text{Eq. 3}$$

Com dados de processo de até 65 unidades produtoras associadas ao Centro de Tecnologia Canavieira, o programa Controle mútuo agroindustrial fornece uma excelente caracterização em termos de eficiências setoriais tanto na agricultura quanto no processamento industrial da cana-de-açúcar para produção de açúcar, bioetanol, geração de energia e outros produtos, sendo utilizado nesta pesquisa, o Controle mútuo referente à safra 2005<sup>14</sup>. O Controle mútuo é utilizado no âmbito dos associados do Centro De Tecnologia Canavieira como base de comparação.

Os anos 90 foram marcados pelos estudos de dinâmica populacional na fermentação. De acordo com Basso (2006), a utilização da técnica da

---

<sup>12</sup> FINGUERUT, J.; ROSSELL, C.E.V. **Relatório Técnico Referente à Produção de Subprodutos na Fermentação Alcoólica**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1985. 15p. (RT-188-85/86).

<sup>13</sup> CÉSAR, A.R.P.; FINGUERUT, J. **Relatório Técnico Referente à Produção de Subprodutos na Fermentação Alcoólica**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, 1992. 12p. (RT-581-92/93).

<sup>14</sup> CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – Controle mútuo agroindustrial safra 2005/06. Piracicaba, 2006.

cariotipagem eletroforética (STROPPA, 2002) para a identificação de leveduras (espécies e linhagens) na década de 1990 permitiu a seleção das primeiras linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com habilidade de permanência nos processos industriais e uma visão da enorme biodiversidade de leveduras no ambiente da fermentação, de onde se pode resgatar linhagens com as mais variadas características para a utilização em outras aplicações biotecnológicas. Segundo o autor, o primeiro impacto resultante da técnica da cariotipagem foi que as linhagens de *Saccharomyces*, tradicionalmente empregadas (de panificação, IZ-1904, TA, assim como outras), não sobreviviam no ambiente de fermentação por mais de 30 dias, sendo substituídas por linhagens indígenas (também mencionadas como selvagens). Ainda segundo Basso (2006), o estudo das características fermentativas das linhagens selvagens isoladas de processos industriais permitiu a seleção de cepas apropriadas à fermentação com reciclo, como conduzida no país, para alto rendimento em etanol, baixa formação de glicerol, não floculante, não formadora de espuma, manutenção de alta viabilidade celular durante os ciclos e altos conteúdos celulares de trealose.

Atualmente as linhagens selecionadas mais amplamente utilizadas na indústria (LNF BG-1, LNF CAT-1, LNF PE-2 e LNF SA-1) foram obtidas por apenas dois laboratórios a Fermentec e a Copersucar, que a partir de 1990 iniciaram o programa de seleção explorando a biodiversidade no ambiente das destilarias (AMORIM, 2005; BASSO, 2006). O prefixo LNF da identificação das linhagens de leveduras é referência à empresa LNF Latino Americana que comercializa as linhagens. O prefixo LNF da identificação das linhagens de

leveduras é referência à empresa LNF Latino Americana (LNF, 2010) que comercializa as linhagens.

De acordo com Basso (2006), tais leveduras apresentam uma taxa de implantação até então nunca observada com outras cepas, respondendo em algumas destilarias pela totalidade da biomassa na dorna ao final da safra, ou seja, após um período de mais de 200 dias de ciclos diários, mas em cerca de 40% das destilarias onde são introduzidas, mesmo estas cepas são substituídas por linhagens contaminantes, que na maioria das vezes apresentam características fermentativas indesejáveis (formação de espuma, floculação e incapacidade de metabolizar todo açúcar do mosto). Na mesma direção, outros autores haviam alertado, quase 10 anos antes, que sob condições inadequadas, algumas leveduras com baixa produtividade em etanol poderiam dominar o processo de fermentação, causando sérios prejuízos à indústria (ANDRIETTA et al., 1997). Cabrini e Gallo (1999) fizeram um levantamento das espécies de levedura no processo de produção de etanol na Usina da Pedra em Serrana-SP, usando técnica de taxonomia numérica baseada em testes bioquímicos de assimilação e fermentação de fontes de carbono em amostras mensais de caldo primário, mosto e leite de levedura. De acordo com os autores, na fermentação foi detectada maior incidência da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e destaque para o gênero *Candida* como contaminante; no leite de levedura as espécies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pretoriensis* e *C. entomophila*; no mosto as espécies *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. As observações de Basso (2006) e Cabrini e Gallo (1999) estão de acordo com as afirmações anteriores a cerca da característica do processo de ser aberto e sem contenção de dentro para fora ou

de fora para dentro, e o mosto inocula além de bactérias, leveduras no processo de fermentação.

Basso (2006) avaliou que a estratégia de seleção de linhagens termotolerantes, tolerantes a etanol ou a outro fator considerado isoladamente, não resultou em linhagens com sucesso na indústria pelo fato de que a linhagem para sobreviver no ambiente de fermentação deve ser, simultaneamente, tolerante a muitos fatores estressantes, inclusive a fatores que atualmente não conhecemos. Desse modo, o autor sugeriu que a utilização do próprio processo industrial como pressão seletiva para resultar em linhagens com capacidade de dominância e persistência ao longo dos ciclos vem a ser uma estratégia interessante e que a cariotipagem eletroforética permitiria o isolamento de linhagens com estas características indispensáveis para o processo com ciclo de células, sendo que a seleção seria complementada através da avaliação destas linhagens para bom desempenho fermentativo.

Para o entendimento da dinâmica populacional nas fermentações, Andrietta, Andrietta e Rodrigues (1995) propuseram uma diferenciação entre leveduras baseado em potencial fermentativo, utilizando para os parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento do micro-organismo e as produções específicas de etanol, massa celular, glicerol e ácidos orgânicos, sempre em relação ao ART consumido. Com o objetivo de melhorar o desempenho das fermentações, Andrietta, Migliari e Andrietta (1999) desenvolveram uma metodologia de classificação de leveduras quanto a sua capacidade fermentativa, levando-se em conta as características cinéticas e parâmetros de rendimento e produtividade das linhagens, em mosto sintético



padrão contendo glicose (150g/l) suplementado com extrato de levedura (6 g/l) e sais minerais. Com essa metodologia os autores avaliaram o grau de heterogeneidade da população de leveduras em fermentações industriais quanto as suas respectivas capacidades fermentativas e recomendaram que as partidas dos processos fossem feitas com fermentos selecionados nas próprias unidades na safra anterior, utilizando as linhagens melhores classificadas.

## 2.8 Referências Bibliográficas

ABRAHAM, G.; DEBRAY, E.; CANDAU, Y.; PIAR, G. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.10, p. 3073-3080, 1990.

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

ALCARDE, V.E.; GALLO, C.R.; OLIVEIRA, A.J. Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. **Semina. Revista Cultural E Científica Da Universidade Estadual De Londrina**, v. 17, n. 2, p. 223-227, 1996.

ALCARDE, V.E.; YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. **Stab**, v. 21, n. 4, p. 40-42, 2003.

ALVARENGA, V.O. **Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana-de-açúcar**. 2008. 179p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Departamento de Ciência de Alimentos-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

AMORIM, H.V. (org). **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p.

ANDRIETTA, S.R. Conceitos de processos de fermentação alcoólica contínua. In: Atualização Tecnológica na Indústria Sucroalcooleira: **Apostila do curso. Piracicaba**, 1997. CPQBA-UNICAMP/Stab, 12p.

ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala industrial**. 1994. 178p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **Stab**, v.13, n.4, p. 22-25, 1995.

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**, v.17, n.5, p. 54-59, 1999.

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

AWUAH, G.B.; RAMASWAMY, H.S.; ECONOMIDES, A. Thermal processing and quality: Principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 584–602, 2007.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986. 984p. (second edition).

BASILIO, A.C.M.; DE ARAÚJO, P.R.L.; DE MORAIS, J.O.F.; DA SILVA FILHO, E.A.; DE MORAIS JR, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, p. 322 – 326, 2008.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 77-82, 1997.

BASSO, Luis Carlos. Fisiologia e ecologia microbiana. In: Workshop 1º Workshop tecnológico de produção de etanol- Projeto PPPP – Diretrizes de políticas públicas para a agroindústria canavieira do estado de São Paulo, Sessão 2, 2006, Lorena, São Paulo. Disponível em:  
<[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper\\_sessao\\_2\\_Basso.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessao_2_Basso.pdf)>. Acesso em 30/mar/2010.

BAYROCK, D.P.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 498–502, 2003.

BAYROCK, D.; INGLEDEW, W.M. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 39 – 45, 2001.

BELTRÁN, C.I.B. Structural and environmental aspects of bioethanol production in Colômbia. **International Sugar Journal**, v. 109(1297), p. 41-45, 2007.

BISHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC, K.A; LEATHERS, T.D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, p. 739-744, 2007.

BRAZZACH, M.L. **Emprego de desinfetantes químicos em fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana**. 1970. 39 p. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

BROMBERG, R.; YOKOYA, F. Chemical modification of cell surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT105 and their effect on flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 508-511, 1995.

BURTON, H.; PERKIN, A.G.; DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. **Journal of Food Technology**, v. 12, p. 149-161, 1977.

BUSTA, F.F. Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultrahigh temperatures. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 640-645, 1967.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em Usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 1, p. 1-10, 1999.

CANELLAS, L.P.; VELLOSO, A.C.X.; MARCIANO, C.R.; RAMALHO, J.F.G.P.; RUMJANEK, V.M.; REZENDE, C.E.; SANTOS, G.A. Chemical soil properties of an inceptisol under long-term sugarcane crops with vinasse application and without slash burning. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 27(5), p. 935-944, 2003.

CASADEI, M.A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J.E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **Internation Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 125-134, 2001. Disponível em: <[www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>. Acesso em 16 mar. 2004.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR - DIVISÃO INDUSTRIAL. Manual de controle microbiológico da usina de açúcar e álcool. **Cadernos Copersucar - Série Industrial**, Piracicaba, v. 5, p.1-10, 1983.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. Fundamentos dos processos de fabricação de açúcar e álcool. **Cadernos Copersucar – Série Industrial** – Piracicaba, nº 20, p. 1-12, 1ª edição, 1988.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. Perdas na fermentação: é possível reduzir! **Industrial Informa**, Piracicaba, n. 50, p. 1-2, 1996.

CHANG, I.S.; KIM, B.H.; SHIN, P.K. Use of Sulfite and Hydrogen Peroxide To Control Bacterial Contamination in Ethanol Fermentation. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 63(1), p. 1–6, 1997.

CLAEYS, W.L.; SMOUT, C.; VAN LOEY, A.M.; HENDRICKX, M.E. From Time Temperature Integrator Kinetics to Time Temperature Integrator Tolerance Levels: Heat-Treated Milk. **Biotechnology Progress**, v. 20, 1-12, 2004.

CO, C.; MARQUES M.O.; TASSO L.C. Sugarcane technologycal parameters affected by sewage sludge an vinasse added in soil for four consecutive years. **Engenharia Agricola**, v. 28(1), p.196-203, 2008.

CRUZ, R.L.; RIGHETTO, A.M.; NOGUEIRA, M.A. Experimental investigation of soil and groundwater impacts caused by vinasse disposal. **Water Science And Technology**, v. 24(11), p. 77-85, 1991.

DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M.; PERKIN, A.G.; BURTON, H. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. **Journal of Food Technology**, v. 12, p. 115-129, 1977.

DE CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: Schmidell, W. et al. (Coord). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v.2, p. 193-204. (Biotecnologia Industrial; v.2).

De FREITAS, C.C. O fenômeno da tolerância das bactéria aos antibióticos. DST – **Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.1(3), p. 103-108, 1989.

DE RESENDE, A.S.; XAVIER, R.P.; de OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, NE. Brazil. **Plant and Soil**, v. 281, p. 339–351, 2006.

DE SOUSA, S.A.V. Advances in utilization of vinasse. In: Macedo, I.C. (org). **Sugar Cane's Energy- Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability**. 1<sup>st</sup> edition. São Paulo: Berlendis Editores Ltda, 2005. p. 165-171.

DEMATTÊ, J.A.M.; GAMA, M.A.P.; COOPER, M.; ARAÚJO, J.C.; NANNI, M.R.; FIORIO, P.R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. **Geoderma**, v.120, p. 187–200, 2004.

DEVANTIER, R.; SCHEITHAUER, B.; VILLAS-BÔAS, S.G.; PEDERSEN, S. and OLSSON, L. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 703-714, 2005.

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

ELSZTEIN, C.; de MENEZES, J.A.S.; de MORAES JR, M.A. Polyhexamethyl biguanide can eliminate yeasts from fuel-ethanol fermentation process. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 967-973, 2008.

EUROPA. Council and Parliament prohibit antibiotics as growth promoters: Commissioner Byrne welcomes adoption of Regulation on feed additives. **Europa Press Realeses Rapid**, Brussels, 2003. Disponível em <<http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/03/1058&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>> acesso em 25 abr. 2010.

FINGUERUT, J.; LEIMER, K.H.; LUCREDI, H.A.; ROSSELL, C.E.V. Considerações sobre o cálculo do rendimento da fermentação alcoólica contínua e descontínua. **Boletim Técnico Copersucar 28/84**, Piracicaba, n. 10, p. 20-26, 1984.

FINGUERUT, J.; LEIMER, K.H.; LUCREDI, H.A.; ROSSELL, C.E.V. Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. **Boletim Técnico Copersucar 35/85**, Piracicaba, n. 12, p. 45-48, 1985.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; ROSSELL, C.E.V. Fermentação alcoólica em usinas cooperadas: evolução e perspectivas. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 23, p. 8-11, 1983.

FRANCHI, M.A.; SERRA, G.E.; CRISTIANINI, M. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, p. 2310-2315, 2003.

FRANCHI, M.A.; SERRA, G.E.; SVILOSEN, J.; CRISTIANINI, M. Thermal death kinetics of bacterial contaminants during cane sugar and alcohol production. **International Sugar Journal**, v. 105, n. 1259, p. 527-530, 2003.

FRANCO, A.; MARQUES, M.O.; DE MELO, W.J. Sugarcane grown in an oxisol amended with sewage sludge and vinasse: Nitrogen contents in soil and plant. **Scientia Agricola**, v. 65(4), p. 408-414, 2008.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO. Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (PPPP). **Diretrizes de políticas públicas para a agroindústria canavieira do estado de São Paulo**. SÃO PAULO, 2006, p.1-20.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão. **Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n.4/5, p. 35-40, 1991.

GHANI, A.G.A.; FARID, M.M.; CHEN, X.D; RICHARDS, P. A computational Fluid dynamics study on the effect of sterilization temperatures on bacteria deactivation and vitamin destruction. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers**, v. 215 Part E, p. 9-17, 2001.

GIBBONS, W.R.; WESTBY, C.A. Use of potassium meta bisulfite to control bacterial contaminants during fermentation of fodder beet cubes for fuel ethanol. **Biomass**, London, v 11, n 2, p 99-113, 1986.

GILBERT, P.; BROWN, M.R.W. Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents. In: (Lappin-Scott H. M. and Costerton J. W., editors). **Plant and Microbial Biotechnology Research Series**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. Vol. 5, p. 118-130.

GLOEDEN, E. **Monitoramento da qualidade da água das zonas não saturada e saturada em área de fertirrigação com vinhaça**. 1994. Dissertação (Mestrado), Instituto de Geociências, Universidade de São de Paulo, São Paulo.

GOUTHIER, H.A.; MASSAGUER, P.R. Determinação da resistência térmica de micro-organismos indicadores da esterilização em caldo de cana. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, XIV, 1987, Viçosa-MG. **Resumo**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987, D12, p. 46-47.

GUNKEL, G.; KOSMOL, J.; SOBRAL, M.; ROHN, H.; MONTENEGRO, S.; AURELIANO, J. Sugar cane industry as a source of water pollution – case study on the situation in Ipojuca river, Pernambuco, Brazil. **Water, air, soil pollut**, 180, p. 261-269, 2007.

HAESE, D.; SILVA, B.A.N. Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1 (1), p.07-19, 2004.

HARDY, J.; PARMETIER, M.; FANNI, J. Functionality of nutrients and thermal treatments of food. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, p. 579-585, 1999.

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

HOHMANN, S.; KRANTZ, M.; NORDLANDER, B. 2007. Yeast osmoregulation. **Methods in Enzymology**, v. 428, p. 29-45, 2007.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p. 284-291, 1997.

ICIEK, J., PAPIEWSKA, A.; MOLSKA, M. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 406-410, 2006.

JORNALCANA. Os impressionantes números do setor sucroenergético (Safrá 2008/09). Edição n.196 de abril/2010. Disponível em <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>>. Acesso em 05 abril 2010.

KAJI, D.A. **Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica**. 1989. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

KLAUSHOFER, H.; CLARKE, M.A.; REIN, P.W.; MAUCH, W. Microbiology. In: (Van der Poel, P.W., Schiweck, H. and Schwartz T., editors). **Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture**. Berlin: Verlag Dr. Albert Bartens KG. 1998. p993 – 1008.

KWOK, K.C.; LIANG, H.H.; NIRANJAN, K. Optimizing Conditions for Thermal Processes of Soy Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4834-4838, 2002.

LEÃO, R.M. **Dedini: a força de um ideal**. Piracicaba: R. M. Leão. 2005. disponível em: [http://issuu.com/dedini/docs/book\\_dedini/158?mode=a\\_p](http://issuu.com/dedini/docs/book_dedini/158?mode=a_p). Acesso em 27 Maio 2010.

LEDERGERBER, U.; REGULA, G.; STEPHAN, R.; DANUSER, J.; BISSIG, B.; STÄRK, K.D.C. Risk factors for antibiotic resistance in *campylobacter spp.* isolated from raw poultry meat in Switzerland. **BMC Public Health**, v. 3, n. 39, 2003. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/39/abstract>>. Acesso em 15 set. 2004.

LELIS NETO, J. A. **Monitoramento de componentes químicos da vinhaça aplicados em diferentes tipos de solo**. Dissertação (Mestrado). 2008. 88p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ-USP, Piracicaba-SP.

LIMA, L.R.; MARCONDES, A.A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, 2002. 248p.

LIMA, T.C.S.; GRISI, B.M.; BONATO, M.C.M. Bacterial isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 214-224, 1999.  
LNF. LNF Latino Americana. 2010. Disponível em <http://www.lnf.com.br/index.html>. Acesso em 04/jun/2010.

LOPES, A.S. **Solos sob “cerrado”: Características, propriedades e manejo**. Piracicaba: Instituto da Potassa & Fósforo: Instituto Internacional da Potassa, 1983. 162p.

LUCREDI, A.H.; FINGUERUT, J.; LEIMER, K.H.; ROSSELL, C.E.V.; YOKOYA, F. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a fermentação. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 27, p. 25-28, 1984.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces Cerevisae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. 2001. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, (21), pp. 63-68, 2001.

LUONG, J.H.T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, p. 280-285, 1985.

MACEDO, I.C. (Org.) **Sugar Cane's Energy-Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability**. São Paulo: Berlendis & Vertecchia: UNICA, 2005, 237p.

MACMASTER, L.; RAVNÖ, A.B. Sucrose loss in diffusion with reference to thermophilic bacteria and lactic acid. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, p. 49-52, 1975.

MADSEN, R.F.; VAN DER POEL, P.W.; SCHIWECK, H.; GUTSER, R.; KOLBERG, J.A.; DELAVIER, H-J; MOLLER, G. R. Juice Purification. In: (van der Poel, P.W.; Schiweck, H. and Schwartz, T. eds). **Sugar Technology: Beet and Cane Sugar Manufacture**. Berlin: Verlag Dr Albert Bartens KG, 1998. pp. 509-510.

MAEDA, A.H. **Estudo de bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool**. 1999. 67 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

MAIORELLA, B.; WILKE, Ch.R.; BLANCH, H.W. 1981. In: ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING. **Bioenergy**. New York. 1981. v. 20, p. 42-92.



MARILLER, C. **Distillerie et agricole et industriellelevurerie, sous-produits**. Paris: Baillière, 1951. 632p.

MARQUES, M.O.; MACHADO, J.O. Efeitos de tratamentos térmicos sobre os parâmetros tecnológicos do mosto e vinho. **Ciência Agrônômica**, Jaboticabal, v. 5(1), p.3-9, 1990.

MARQUES, M.O.; MACHADO, J.O.; OLIVEIRA, F.C. Efeito de tratamentos térmicos em caldo de cana sobre parâmetros microbiológicos do vinho. **Ciência Agrônômica**, Jaboticabal, v.5(2), p.39-42, 1990.

MARTINELLI, L.A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and social challenges. **ECOLOGICAL APPLICATIONS**, v. 18(4), p. 885-898, 2008.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of Lactobacilli on Yeast-Catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63(11), p. 4158-4163, 1997.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66(10), p. 4187–4192, 2000.

NAVARRO, A.R.; SEPÚLVEDA, M. DEL C.; RUBIO, M.C. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste Management**, v. 20, p. 581-585, 2000.

NEGRO, M.R.G.O.C.; YOKOYA, F.; EBERLIN, M.N. The chemical composition of “canjica” a polymeric material found in brazilian sugar cane industry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 625-630, 2003.

NOBRE, T.,de P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27(1), p. 20-25, 2007.

NOLASCO JUNIOR, J. **Desenvolvimento de processo térmico otimizado para mosto de caldo de cana na fermentação alcoólica**. 2005. 181 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

NOLASCO JUNIOR, J.; DE MASSAGUER, P.R. Thermal death kinetics of *G. stearothermophilus* spores in sugarcane must. **Journal of Food Process Engineering**, v.30, p. 625-639, 2007.

NOLASCO JUNIOR, J.; DE MASSAGUER, P.R. Thermal degradation kinetics of sucrose, glucose and fructose in sugarcane must for bioethanol production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, p. 462-477, 2006.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 25-31, 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brasileian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 10-14, 2001.

OLIVEIRA, D.T.; PIZAIA, W.; ACKERMANN, H.P.H.; ROSSELL, C.E.V. Alternativas de Processo no Tratamento do Caldo para Destilaria. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 36, p. 25-31, 1987.

OLIVEIRA, I.M.A. **Efeito do tratamento térmico e da defecação simples do caldo de cana sobre a concentração de N, P e a fermentação alcoólica**. 1986. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – ESALQ, Piracicaba, 1986.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*, **Scientia agricola**, v. 55, n. 3, p. 1-12, 1998.

OMETTO, J. G. S. **O álcool combustível e o desenvolvimento sustentado**. São Paulo: PIC, 1998. 80p.

PERKIN, A.G.; BURTON, H.; UNDERWOOD, H.M.; DAVIES, F.L. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. **Journal of Food Technology**, v. 12, p. 131-148, 1977.

PESSANHA, R.P.; GONTIJO FILHO, P.P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]**, v.53(1), p. 111-115, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 10/01/2010.

PFLUG, I.J. **Microbiology and Engineering of Sterilization Processes**. 7ª edição. Minneapolis, MN/USA: Environmental Sterilization Laboratory, 1990.

PIZAIA, W.; OLIVEIRA, D.T.; ROSSELL, C.E.V. Aquecimento por contato direto e resfriamento por flash aplicado ao tratamento de caldo para destilaria. **Stab**, p.124-126, Julho-Agosto, 1986.

RUCKLE, L. Hop acids as natural antibacterials in ethanol fermentation. **International Sugar Journal**, v.107(1275), p.162-165, 2005.

SAMORANO, K.S.; FARIA, J.A.F. Avaliação da qualidade caldo de cana envasado a quente e por sistema asséptico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, 72-80, 2006.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Economia e Planejamento. **Macrozoneamento das Bacias dos Rios Mogi Guaçu, Pardo e Médio-Grande: Questões Sócio-Ambientais Regionais**. São Paulo, 1995, p.15-25.

SCHELL, D.J.; DOWE, N.; IBSEN, K.N.; RILEY, C.J.; RUTH, M.F.; LUMPKIN, R.E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2941-2948, 2007.

SHVETS, V.N. Kinetics of sucrose decomposition reaction during molasses sterilization. **Izvestiya Vcheknykh Zaudenui, Pishchevaya Tekhnologiya**, v.4, p.127-129, 1976.

SHVETS, V.N.; SLYUSARENKO, T.P.; PATSERA, A.I. Heat stability of molasses during sterilization. **Kharchova Promislovist' (Respublikans'kii Mizhvidomchii Naukovo-tekhnichnii Zbirnik)**, v.14, p. 37-41, 1972.

SINGH, S.; SINGH, M.; RAO, G.P.; SOLOMON, S. Application of distillery spent wash and its effect on sucrose content in sugarcane. **Sugar Techonoly**, v. 9(1), p. 61.66, 2007.

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

SKINNER-NEMEC, K.A.; NICHOLS, N.N.; LEATHERS, T.D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 379–383, 2007.

SLYUSARENKO, T.P.; SHVETS, V.N.; KNOGOTKOVA, E.I. Changes in the technological and microbiological parameters of molasses-based diluted syrups during sterilization. **Izvestiya Vcheknykh Zaudenui, Pishchevaya Tekhnologiya**, v.6, p.115-118, 1972.

STEWART, P.S.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Biofilm antimicrobial resistance In: (GHANNOUM, M. and O'TOOLE, G. A., editors). **Microbial Biofilms**. Washington: Asm Press. 2004. p 250-268.

STROPPIA, C.T. **Dinâmica Populacional de Leveduras Caracterizadas por Eletro-cariótipo e Desempenho Fermentativo em Processos de Fermentação**

**Alcoólica**. 2002. p.133. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

STROPPIA, C.T.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G.E. Use of penicillin and monesin to control bacterial contamination of brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**, v. 102, n. 1214, p. 78-82, 2000.

STROPPIA, C.T.; STECKELBERG, C.; SERRA, G.E.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. Consumo de açúcar por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica associado ao uso de antibióticos. **Stab- Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 16, p. 35-38, 1998.

TAUK, S.M. Effects of cumulative doses of vinasse on soil microorganisms in cerrado. **Pedobiologia**, v. 34, p. 69-75, 1990.

THAL, L.A.; ZERVOS, J.M. Occurrence and epidemiology of resistance to virginiamycin and streptogramins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 171-176, 1999.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 819-828, 2001.

TORRES, A.P.; OLIVEIRA, F.A.R. Residence time distribution studies in continuous thermal processing of liquid foods: a Review. **Journal of food engineering**, 36, p. 1-30, 1998.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de Etanol**. 2002. 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

TROMBINI, M.A.M.; ROVANHOL, A.A.; VITTI, L.S.S.; BEDA, D.F.; PORTO, R.C.B.; SÁ, J.S. Causas da contaminação e suas consequências em usinas de açúcar e álcool. **Stab**. v. 16, n. 6, 18p., 1988.

UNION OF CONCERNED SCIENTISTS. **Prescription for trouble: Use of antibiotics to fatten livestock**. Disponível em [http://www.ucsusa.org/food\\_and\\_agriculture/science\\_and\\_impacts/impacts\\_industrial\\_agriculture/prescription-for-trouble.html#](http://www.ucsusa.org/food_and_agriculture/science_and_impacts/impacts_industrial_agriculture/prescription-for-trouble.html#)>. Acesso em 26 mai. 2010.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of *faecal enterococci* in poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 497-505, 2002. Disponível em: <<http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>>. Acesso em 10/01/2005.

VIEGAS, M.C. **Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras com Características Floculantes.** 2003. 135p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **ISSN 1810-0791**, V. 1(4), Brasília, Março de 2004.

WATANABE, I.; NAKAMYURA, T.; SHIMA, J. A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida grabata* in biethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1117-1122, 2008.

WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M.; FOEGEDING, P.M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 446-450, 1995.

WILKIE, A.C.; RIEDESEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.19, p. 63-102, 2000.

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

# Capítulo 3

**Verificação experimental de processo térmico para mostos a base de caldo de cana e melaço para produção de bioetanol em unidade piloto de esterilização contínua**

**Artigo que será submetido à revista Journal of Food Process Engineering, segundo normas de submissão da revista.**

**Verificação experimental de processo térmico para mostos a base  
de caldo de cana e melaço para produção de bioetanol em  
unidade piloto de esterilização contínua**

**J. Nolasco Junior <sup>1</sup> e P.R. De Massaguer<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup> Universidade de Campinas-UNICAMP, Faculdade de Engenharia de  
Alimentos (FEA) /Departamento de Ciência de Alimentos, Rua Monteiro  
Lobato, 80, Campinas-São Paulo/Brasil C.P. 6121 – CEP 13083-862.**

**<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, Faculdade de Engenharia  
Química (FEQ)/Departamento de Processos Químicos, Rua Albert Einstein,  
500, CP 6066, CEP 13083-852 – Campinas-São Paulo Brasil.**

**<sup>1</sup> A quem correspondência deve ser enviada. R Luiz José Mesquita, 407,  
13403-855, Piracicaba-SP-BRASIL, fone +55-021-19-33010448,  
Jonas.nolasco@terra.com.br**

**Running Title: Processo térmico contínuo para mostos a base de caldo de cana e melaço.**

## **Resumo**

Neste trabalho foi estudada, em unidade piloto de esterilização contínua, a eficiência do processo térmico otimizado para mostos de caldo de cana e melaço. O processo foi definido graficamente pela região com limite superior representado por curvas de preservação de 98.70% da sacarose e dos açúcares redutores do mosto e com limite inferior pela curva TDT para causar redução de 3 ciclos logarítmicos na população inicial de esporos de *G. stearothermophilus*, foi verificada em unidade piloto de esterilização contínua Microthermics®, com aquecimento indireto, nas temperaturas 125°C, 130°C e 135°C. O processo térmico foi definido a partir de estudos cinéticos de destruição térmica dos esporos de *G. stearothermophilus* em mosto a 21.5°Brix e pH=6.4 nas temperaturas 98°C, 110°C, 120°C, 122.5°C e 130°C pelo método dos tubos TDT. A condição de processo a 135°C foi obtida por extrapolação dos dados. Em média, os valores encontrados de número integral de reduções logarítmicas (2.55, 2.12 e 3.08) foram 7.17% maiores que os valores integrais calculados (2.03, 2.10 e 3.09) a partir dos perfis térmicos estimados para cada processo térmico e utilizando os tempos médios de tratamento e as temperaturas médias na retenção como temperaturas de referência. A preservação da sacarose foi maior que 99.20%, enquanto que a preservação dos açúcares redutores totais foi superior a 99.52%.

## **Aplicações Práticas**

Os dados dessa pesquisa podem ser usados para dimensionar um projeto em escala industrial para processamento térmico de mostos a base de caldo de cana e melaço a fim de controlar os contaminantes da fermentação alcoólica sem uso



de antibióticos, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia de produção de biocombustíveis.

## **Introdução**

O bioetanol combustível produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto de cana-de-açúcar, processo cujas principais características são alta densidade celular, curto tempo de processo (< 8 horas) e reciclo das leveduras com tratamento ácido de acordo com o processo de Melle-Boinot patentes nº 746778/770666 de 1933 (Gonzales e Rossell 1986; Mariller 1951). Outra importante característica dos projetos de fermentação em escala industrial é que eles não são assépticos e os equipamentos e o processo não seguem critérios sanitários de projeto. Como consequência direta dessas características o processo de fermentação admite uma grande microbiodiversidade em seu volume de controle competindo pelos substratos e causando prejuízos (Centro de Tecnologia Copersucar 1996), sendo que esse fato é potencializado pela prática do reciclo de células (Yokoya e Oliva-Neto e 1991).

A microflora do agrossistema de cana-de-açúcar brasileiro tem sido objeto de muitos estudos dada a importância desse setor na economia do Brasil. Essa importância cresce a cada ano devido ao bioetanol ser a única alternativa imediata de produção de combustível renovável em escala comercial para substituição de combustíveis fósseis. De acordo com Gallo e Canhos (1991), os gêneros bacterianos mais frequentes no agrossistema de cana-de-açúcar brasileiro foram *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%) inclusive o *G. stearothermophilus* formador de esporos de maior resistência térmica entre os contaminantes reportados. Levantamento feito em usinas cooperadas ao sistema Copersucar

mostrou que o setor de fermentação era responsável por 30 a 60% das perdas totais determinadas na indústria de açúcar e álcool, a maior parte delas relacionadas aos contaminantes microbiológicos daquela etapa do processo (Centro de Tecnologia Copersucar 1996). O gerenciamento do processo é baseado totalmente em estratégias corretivas mediante uso contínuo de ácido sulfúrico previamente ao reciclo de fermento e uso intensivo de antibióticos, após a verificação de problemas operacionais, sendo que durante a safra 2005/06 foram consumidos 8.7g de antibióticos/m<sup>3</sup> de etanol produzido (Centro de Tecnologia Canavieira 2006). Antibióticos também são usados no controle de contaminantes nas fermentações de milho para produção de etanol combustível nos Estados Unidos da América (Bishoff *et al.* 2007; Schell *et al.* 2007; Bayrock *et al.* 2003; Hynes *et al.* 1997). O uso intensivo de antibióticos tem sido apontado como uma das fontes não humanas principais que sustenta o aparecimento de bactérias nocivas ao Homem, resistentes a antibióticos (Thal e Zervos 1999; Van Den Bogaard *et al.* 2002; Ledergerber *et al.* 2003, Pessanha e Gontijo Filho 2001).

Para evitar esta prática, Nolasco Junior (2005) desenhou um processo térmico otimizado graficamente pela preservação dos açúcares do mosto e pela redução de 5 ciclos logarítmicos nos esporos de *G. stearothermophilus*, micro-organismo alvo, a partir de estudos cinéticos em batelada em tubos TDT.

Tem sido reportado por outros autores que processos térmicos contínuos seriam mais eficientes que processos em batelada, possivelmente devido a aquecimento não isotérmico que poderia causar germinação de esporos e também pelo modelo utilizado para estimativa do perfil térmico durante o processamento

(Davies *et al.* 1977; Perkin *et al.* 1977; Burton *et al.* 1977; Wescott *et al.* 1995; Fernández *et al.* 2001; Pacheco-Sanchez 2005; Tamega Junior 2005). Portanto a utilização de processos contínuos, desenhados a partir de parâmetros cinéticos de inativação térmica obtidos em batelada, poderiam causar sobreprocessamento com prejuízo para as qualidades nutricionais e sensoriais do produto.

Até o final do século 20 o esforço de otimizar processos térmicos se concentrava em processo para enlatados e também para leite e após o ano 2000, poucas pesquisas sobre processos contínuos visto que muitos pesquisadores se dedicaram a estudar alternativas não térmicas para a esterilização ou pasteurização tais como alta pressão, ultra violeta, aquecimento ôhmico, entre outras. Entre as pesquisas com otimização de processos térmicos contínuos vale destacar os trabalho de Kwok *et al.* (2002) que otimizaram graficamente um processo térmico, numa ampla faixa de temperaturas, para fatores de qualidade importantes do leite como atividade inibidora de tripsina, retenção de tiamina e riboflavina, cor e aroma conseguindo reter 90-93% da tiamina em um processo a 143C/60s. De maneira similar Claeys *et al.* (2004), a partir de estudos cinéticos de formação e destruição de produtos denominados integradores térmicos (enzimas alcalina fosfatase e lactoperoxidase, a proteína  $\beta$ -lactoglobulina e os compostos químicos hidroximetilfurfural, lactulose e furosina), desenharam diagramas gerais de tempo e temperatura de tolerância para os produtos a fim de avaliar o processo térmico submetido ao leite sem conhecimento da história térmica do processo. Awuah *et al.* (2007) destacaram as vantagens dos processos térmicos contínuos, o reconhecimento do FDA pelo efeito letal integral do processo incluindo o

aquecimento e resfriamento desde que acompanhado de dados justificativos e chamaram a atenção para a questão da determinação da distribuição dos tempos de residência, tarefa especialmente complexa no caso de alimentos contendo sólidos grandes e previram o uso de novas tecnologias para ajudar a resolver parte dos problemas com validação global do processo usando marcadores microbiológicos, marcadores químicos como enzimas ou outros indicadores apropriadamente calibrados. Nenhum trabalho sobre otimização de processos térmicos de mosto de caldo de cana foi encontrado nas bases referenciais pesquisadas Web of Science, Compedex, Food and Science and Technology e Scopus. Apenas alguns trabalhos sobre tratamento térmico em melaço, material com alta concentração de sólidos solúveis foram encontrados (Shevets *et al.* 1972; Slyusarenko *et al.* 1972; Shvets 1976).

O objetivo desse trabalho foi verificar o processo térmico desenhado por Nolasco Junior (2005) a partir de cinéticas de destruição térmica obtidas em batelada (Nolasco Junior e De Massaguer 2006; Nolasco Junior e De Massaguer 2007).

## **Material e Métodos**

### **Preparo do mosto**

O mosto a 21.5ºBrix composto por 15% (v/v) de caldo de cana proveniente dos filtros a vácuo das Usinas a 13.2ºBrix, por 22% (v/v) de mel final a 60ºBrix e o restante 63% (v/v) de caldo de cana do segundo terno de extração da moenda a 10ºBrix, foi clarificado para remoção de impurezas à semelhança do processo de clarificação industrial, esterilizado a 121ºC/40 minutos e mantido resfriado a 0ºC

em câmara fria até a realização dos processos térmicos. O processo de clarificação consistiu de adição de ácido fosfórico 0.25 mL/litro de mosto, calagem com leite de CaO a 10<sup>º</sup>Be até pH = 6.4 seguido de aquecimento até fervura a pressão atmosférica, dosagem do polímero aniônico Magnafloc LT22®, poliacrilamida, (BASF Co, Suffolk-VA/EUA) (4 mL/litro de mosto) e decantação à temperatura 2-3<sup>º</sup>C abaixo da temperatura de ebulição, em kit de decantação composto de quatro provetas graduadas de 1 litro, dotado de lâmpadas incandescentes com regulador de intensidade luminosa para controle de temperatura interna. Após o processo de clarificação o mosto resultante apresentou 21.5<sup>º</sup>Brix e pH = 6.14. Os tratamentos térmicos foram realizados no laboratório de Termobacteriologia da FEA/UNICAMP. Para efeito de simplicidade toda referência a mosto neste trabalho será relativa a mosto com a composição acima descrita.

### **Suspensão de esporos principal**

Foi utilizada a suspensão de esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 1518 estocada a 4<sup>º</sup>C preparada segundo descrito por Pflug (1990) utilizada nos ensaios de cinética de destruição térmica (Nolasco Junior e De Massaguer 2007). A determinação da concentração de esporos foi realizada em duplicata com choque térmico de 15 minutos a 98<sup>º</sup>C, seguido de resfriamento rápido em banho de gelo, diluição e plaqueamento em meio Triptona Soja Agar (TSA, Oxoid®), com incubação a 55<sup>º</sup>C/48h e contagem de sobreviventes.

## **Suspensão de esporos para inoculação em mostos**

Foram preparadas, a partir de 2.25mL da suspensão principal de esporos, suspensões para inoculação direta com volume e concentração aproximados de 225 mL e  $5.65 \times 10^8$  esporos/mL, respectivamente, nos mostos a serem tratados termicamente.

## **Unidade Piloto de esterilização Contínua**

Esta pesquisa foi realizada na unidade piloto de esterilização contínua (MicroThermics® UHT/HTST, Raleigh NC/USA, modelo lab 25DH), Figura-1. A unidade é equipada com três (3) trocadores de calor tubulares em espiral sendo um para preaquecimento que utiliza água quente como fonte térmica, um para aquecimento final que utiliza vapor saturado a  $4\text{kgf/cm}^2$  como fonte térmica e um resfriador final, que utiliza água gelada, a temperatura de  $10^\circ\text{C}$ , para resfriamento final do produto processado. A unidade possui três conexões usadas como tubos de retenção, denominadas EH2, EH3 e EH4 que, para vazão de 1L/min, apresentam individualmente tempo de residência nominal de 30s. Possui também uma conexão de retenção denominada retenção para bebidas que, na vazão de 1L/min, apresenta tempo de residência nominal de 6s. Os tempos de residência citados são nominais, apenas para referência, calculados para água, utilizando a velocidade média de escoamento. Os tubos de retenção podem ser usados isoladamente ou combinados em série para atingir o tempo de tratamento do processo em função da vazão. A unidade é equipada com bomba de velocidade variável que permite trabalhar com produtos de diferentes viscosidades numa faixa de vazão de até 3L/min e contra pressão de até  $7\text{Kgf/cm}^2$ . A unidade é dotada de

termopares tipo T agulhas com 155 mm de comprimento (Ecklund®), instalados à saída do pré-aquecedor, à saída do aquecedor, à saída do tubo da retenção, à saída do resfriador final antes do envase, no produto final e nas utilidades água à saída do pré-aquecedor e vapor de aquecimento. Os dados de vazão e temperatura de processo foram coletados em intervalos de 8s com o aquisitor de dados (Fluke Hydra, Alemanha, modelo 2625 A) e transferidos para computador através de porta serial RS 232.

## FIGURA-1

### **Processos térmicos**

A verificação da eficiência do processo térmico desenhado por Nolasco Junior (2005) foi realizada por inoculação direta da suspensão de esporos de *G. stearothermophilus* ATCC 1518 preparada a partir da suspensão principal conforme descrito anteriormente, visando a obter concentração inicial de  $10^6$  esporos/mL de mosto, de forma a conseguir verificar o numero de reduções causadas mediante recuperação de esporos no mosto. Previamente à inoculação, o mosto estocado para ser utilizado nos processos térmicos, foi avaliado microbiologicamente por incubação de 3 a 5 amostras por 48 horas a 55°C e 30°C, seguida de esgotamento, em triplicata, em Agar Padrão para Contagem (PCA-Oxoid®) e Triptona Soja Agar (TSA- Oxoid®) por 48h a 55°C e 30°C. Para cada um dos processos térmicos realizados, foram utilizados aproximadamente 42L de mosto preparados conforme descrito anteriormente sendo 22L utilizados para

estabilização da unidade nas condições de processo definidas para cada condição de tratamento térmico e 20L que foram inoculados com a suspensão de esporos.

### Definições dos processos térmicos utilizados

A zona de processos térmicos ótimos, originalmente desenhada por Nolasco Junior (2005) teve sua condição limite inferior representada pela curva de tempo e temperatura de destruição térmica (TDT) para causar 5 reduções logarítmicas no micro-organismo alvo, recalculada para causar 3 reduções logarítmicas no micro-organismo alvo, utilizando os parâmetros cinéticos de destruição térmica, Tabela-1, e as curvas de sobreviventes obtidos para o micro-organismo, (Eq.1), (Eq.2) e (Eq.3) usadas por Nolasco Junior e De Massaguer (2007), conforme Pruitt and Kamau (1993) utilizando procedimento de cálculo descrito em Nolasco Junior (2005).

Para T= 98-110°C:

$$\ln(S) = \ln \left[ \frac{1 + e^{-k\tau}}{1 + e^{k(t-\tau)}} \right] \quad \text{Eq. 1}$$

Para T=120-125°C:

$$\ln(S) = \ln \left[ \alpha e^{-k_1 t} + (1 - \alpha) e^{-k_2 t} \right] \quad \text{Eq. 2}$$

Para T=130°C:

$$\ln(S) = -kt \quad \text{Eq.3}$$

TABELA.1



Os limites superiores da zona de processos ótimos estão representados pelas curvas TDT para destruição máxima de 1.3% ou preservação de 98.7% da sacarose e dos ART, foram mantidos como originalmente calculados. Foram executados oito processos térmicos em diferentes condições operacionais, Tabela-2, seis dos quais com o objetivo de se causar no máximo 3 reduções logarítmicas na população inicial de esporos inoculada e dois para causar mais do que 5 reduções logarítmicas.

### **Condições de processos térmicos aplicados**

Foram realizados quatro (4) processos térmicos em duplicata nas temperaturas 125°C, 130°C e 135°C, Tabela-2. A avaliação dos processos foi feita com os dados dimensionais da unidade de esterilização contínua, específicos para cada configuração utilizada, Tabela-3, em conjunto com dados de propriedades de transporte do mosto, Tabela-4, considerando o regime de escoamento definido pelo número de Reynolds, Re, (Eq. 4) para tempo de residência mínimo (Eq.5) e velocidade máxima (Eqs. 6a e 6b) ou velocidade média (Eq. 7) e tempo de residência médio (Eq.8). Um volume de 5L de cada um dos mostos submetidos aos processos térmicos foi coletado em galões previamente higienizados durante 30 minutos com solução VORTEX ES® 0,5% (v/v) (Ecolab do Brasil, à base de ácido peracético) e lavados com 15L de água esterilizada em autoclave (121°C/15min) para remoção do produto e mantidos em câmara fria a 4°C para serem usados nos testes de fermentabilidade.

$$Re = \frac{\gamma^* v^* D_i}{\mu}$$

**Eq.4**

$$Tresidência_{\min} = \frac{L}{V_{\max}} \quad \text{Eq.5}$$

$$V_{\max=1,2*V_{med}} \quad \text{se } Re > 2100 \quad \text{Eq.6a}$$

$$V_{\max=2*V_{med}} \quad \text{se } Re < 2100 \quad \text{Eq.6b}$$

$$V_{med} = \frac{Q}{A} = \frac{4 * Q}{\pi * D_i^2} \quad \text{Eq.7}$$

$$tresidência_{med} = \frac{L}{V_{med}} \quad \text{Eq.8}$$

TABELA-2.

TABELA-3.

TABELA-4.

## **Histórico de processo, perfil de temperatura e letalidade dos processos térmicos.**

Os valores médios dos registros de vazão de processo e de temperatura no final de cada uma das secções da unidade (pré-aquecimento, aquecimento final e produto final estéril) além das temperaturas das utilidades vapor e água à saída do pré- aquecedor, coletados a cada 8s com o aquisitor de dados foram utilizados para calcular o perfil de temperatura dos processos térmicos de acordo com Deindoerfer e Humphrey (1959) em intervalos de 1/20 do tempo de residência calculado de cada secção da unidade, (Eq. 9). Cada processo teve o perfil térmico calculado utilizando o tempo de retenção mínimo e médio, Tabelas 1-16 do apêndice-A, Figuras 4-7.

$$T_t = T_{(H,C)} \left[ 1 + \frac{T_0 - T_{(H,C)}}{T_{(H,C)}} e^{-\left(\frac{U_t A}{w_p c_p}\right)t} \right] \quad \text{Eq. 9}$$

Onde,

$$\left( \frac{U_t A}{w_p c_p} \right) = J = \frac{[\ln abs(T_t - T_{H,C}) - \ln abs(T_0 - T_{H,C})]}{t} \quad \text{Eq.10}$$

A partir do perfil térmico estimado para cada processo, foi calculado o número de reduções logarítmicas de cada secção utilizando a temperatura de processo de ajuste na retenção como temperatura de referência, (Eq.11). O número integral de reduções logarítmicas, (Eq.12), foi calculado como igual à soma do número de reduções logarítmicas de cada secção (Mafart *et al.* 2002) e a partir deste, foi calculado o valor de esterilização à temperatura de processo  $F_T$  (Eq. 14). O valor de Z foi calculado como inverso negativo da declividade do gráfico do logaritmo decimal dos valores dos parâmetros de resistência térmica versus temperatura. Para isso, as constantes cinéticas das curvas de sobreviventes dos esporos, Tabela-1, foram convertidas para parâmetros de resistência térmica,  $D^*$ , mediante a Equação 15, para curvas de sobreviventes ajustadas pelo modelo logístico que apresentam tempo de adaptação  $\tau > 0$ , ou mediante a Equação 16 para curvas de sobreviventes características de população com resistência heterogênea que apresentam duas curvas com velocidades de morte térmicas diferentes e tempo de adaptação  $\tau = 0$  (Pruitt e Kamau 1993). O parâmetro de resistência térmica obtido de cinética não linear recebeu o símbolo  $D^*$  para distingui-lo do convencional parâmetro de resistência térmica, D de Bigelow, obtido a partir de cinéticas de 1ª ordem (Eq. 17). Nolasco

Junior (2005) avaliou que em temperaturas a partir 130°C as curvas de sobreviventes dos esporos de *G. stearothermophilus* deveriam seguir cinéticas de 1ª ordem. O parâmetro de resistência térmica, D, na temperatura de 130°C foi calculado pela equação 17, e pelo fato de não ter ensaios na temperatura de 135°C, o parâmetro de resistência térmica, D, nesta temperatura foi calculado por extrapolação, (Eq. 18) usando a temperatura 130°C como referência e o valor Z obtido nesta pesquisa.

$$n_{calculado} = \sum_i \left( \frac{10^{\left( \frac{T_i - T_R}{z} \right)}}{D_T} \right) * \Delta t \quad \text{Eq.11}$$

$$n_{integral} = \left[ n_{pre-aquecimento} + n_{aquecimento} + n_{reten\c{c}ao} + n_{resfriamento} \right] \quad \text{Eq.12}$$

$$\Delta t = \frac{T_{resid\ência}}{20} \quad \text{Eq.13}$$

$$F_T = n_{integral} * D_T \quad \text{Eq.14}$$

Para  $\tau > 0$ :

$$D^* = \tau + \frac{\left[ \ln(9 + 10e^{-k_1\tau}) \right]}{k_1} \quad \text{Eq.15}$$

Para  $\tau = 0$ :

$$D^* = \frac{\ln(19)}{k_2} \quad \text{Eq.16}$$

$$D = \frac{2.303}{k} \quad \text{Eq.17}$$

$$D_{135C} = D_{130C} * 10^{\left(\frac{130-135}{Z}\right)} \quad \text{Eq. 18}$$

### Plano de amostragem e analítico durante o processo térmico

Após estabilização dos processos térmicos, foram coletadas 2 (duas) amostras de 50mL cada uma do mosto na alimentação e do produto final após processo. Em cada uma dessas amostras foi realizada contagem de esporos sobreviventes por diluição e plaqueamento em duplicata em meio Triptona Soja Agar (TSA-Oxoid®) com incubação por 48-72 h a 55°C. Também foram determinados a concentração dos açúcares redutores glicose e frutose e sacarose, por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo ICS 3000 (Dionex) com membrana de filtração de amostra de acetato/nitrato de celulose de 0.45µ de porosidade, pré-coluna CarboPac MA1 guard (4mm DI x 50mm de comprimento), coluna CarboPacMA1 (4mm DI x 250mm de comprimento) detector de amperometria pulsada e solução de NaOH 480 mM NaOH a 0,4 mL/min como fase móvel, temperatura da coluna de 26°C, tempo de corrida de 60min, volume de injeção de 25µL, padrões de glicose (P/N G8270-100G; Sigma), frutose (P/N F0127-100G; Sigma) e sacarose (S9778-500G; Sigma) e software de aquisição de dados Chromeleon. Com os dados da população antes e após o processo térmico foram calculados o número de reduções decimais efetivas, obtido experimentalmente, denominado  $n_{\text{integral-biológico}}$  (Eq. 19).

$$n_{\text{integral-biológico}} = \log\left(\frac{N_0}{N_{\text{produtofinal}}}\right) \quad \text{Eq. 19}$$

## **Processo CIP/SIP aplicado à unidade piloto de esterilização térmica**

Após cada processo térmico, a unidade piloto foi submetida a processo de limpeza e sanitização, CIP (“clean in place”) e SIP (“sanitization in place”). Antes do início de outro processo a unidade piloto recebia um enxágue com água seguida de esterilização com água superaquecida a 121°C por 15 minutos até o ponto frio do sistema. O processo CIP/SIP consistiu das seguintes etapas e produtos: a) Elsolve® 97 (Ecolab do Brasil, à base de ácido sulfâmico) na concentração de 13 g/L (45-60°C) por 15 minutos, b) enxágue com água a temperatura ambiente por 10 minutos, c) VORTEX ES® (Ecolab do Brasil, à base de ácido peracético) na concentração de 0,5% (v/v) por 15 minutos e d) enxágue com água a temperatura ambiente por 10 minutos. As vazões de operação de CIP/SIP e enxágue, utilizadas após os processos térmicos, foram iguais ao dobro das respectivas vazões adotadas em cada processo térmico limitadas a 3 L/min. A eficiência do processo CIP/SIP aplicado foi avaliada através de ensaios de filtração de 5L da água após o último enxágue do processo CIP/SIP, seguida de plaqueamento em meio Triptona Soja Agar (TSA-Oxoid®) e incubação por 48-72h a 55°C.

## **Resultados e Discussão**

Optou-se por usar a mesma suspensão de esporos *G. stearothermophilus* utilizada por Nolasco Junior e De Massaguer (2007), em vez de produzir outra suspensão, para não introduzir outras variáveis, como por exemplo, suspensão de esporos com resistência térmica diferente da suspensão original (Pflug 1990; Bender e Marquis 1985; Beaman e Gerhardt 1986). A estocagem da suspensão

original a 4°C resultou em apenas 0.25 reduções log arítmicas na concentração da suspensão original de  $1 \times 10^{10}$  esporos/mL preparada por Nolasco Junior e De Massaguer (2007). Quando padronizada para os ensaios desta verificação, a suspensão apresentou concentração média de duas contagens de esporos de  $5.65 \times 10^9$  esporos/mL.

Nos testes para avaliação da eficiência do processo CIP/SIP utilizado não houve recuperação de esporo sobrevivente sendo, portanto, capaz de causar pelo menos 6 reduções logarítmicas nos esporos de *G. stearothermophilus*, já que o inóculo inicial nos processos era ajustado para aproximadamente  $10^6$  esporos/mL.

O processo térmico otimizado de Nolasco Junior (2005) foi desenhado a partir de estudos cinéticos em batelada, utilizando tubos TDT. Processos contínuos são reconhecidamente mais eficientes que processos em batelada para promover germinação e subsequente destruição dos micro-organismos (Tamega Junior 2005; Fernandez *et al.* 2001; Wescott *et al.* 1995; Davies *et al.* 1977; Perkin *et al.* 1977; Burton *et al.* 1977). Em vista disso, foi avaliado que existia risco real de que, quando fossem aplicados processos térmicos, baseados no desenho original para causar 5 reduções logarítmicas em mosto inoculado para aproximadamente  $1 \times 10^6$  esporos/mL, não se obtivessem sobreviventes contáveis com confiabilidade estatística e portanto com chances de se obter resultados imprecisos na região “quantal” como descrito em Pflug (1990). Daí a decisão de recalcular a linha TDT original, limite inferior da zona de processos ótimos, para causar 3 reduções logarítmicas nos esporos de *G. stearothermophilus*, Figura-2.

FIGURA -2

Os mostos à entrada e saída dos processos térmicos, Tabela-2, foram caracterizados em termos de concentração inicial de esporos e dos açúcares sacarose, glicose, frutose e ART, Tabelas-5 e 6. Os tratamentos aplicados foram identificados pela sua temperatura de ajuste seguido de letra referente à repetição. Em todos os processos a retenção de sacarose e de ART foi superior a 99%, acima do valor mínimo especificado de 98.7% utilizado no desenho do processo ótimo por Nolasco Junior (2005). Essa característica é extremamente desejável para evitar as perdas de açúcar por degradação térmica e favorecer o alto rendimento de álcool na fermentação do mosto. É, portanto, possível viabilizar processos térmicos para mosto com elevado nível de retenção de açúcares. Em alguns casos os valores de glicose e frutose, no produto processado, foram superiores ao do mosto antes do processo. Isso pode ser devido a uma leve hidrólise da sacarose, menor que 0.78%, favorecido pelo pH próximo de 6.0 em soluções com alta atividade de água (Nolasco Junior and De Massaguer 2006; Kelly e Brown 1978).

#### TABELA-5.

#### TABELA-6.

As constantes cinéticas,  $k$ , de velocidade de inativação térmica dos esporos de *G. stearothermophilus*, Tabela-1, foram convertidas para índice de redução decimal,  $D^*$ , para cada temperatura com a finalidade de obter o valor do coeficiente térmico,  $Z$ , Figura-3. Apesar da cinética de destruição térmica de *G. stearothermophilus* ATCC 1518 no mosto ser não linear para temperaturas abaixo de 130°C (Nolasco Junior e De Massaguer 2007), os parâmetros de resistência térmica,  $D^*$  ou  $D$ , apresentaram relação linear com a temperatura. Resultados



similares foram encontrados por Marfart (2002) para *B. cereus* e *B. pumilus* aquecidos em água. O valor Z obtido nesta pesquisa, usado na avaliação dos processos térmicos, foi 9.4°C, 2.2% maior que o valor reportado por Nolasco Junior e De Massaguer (2007). Essa diferença é explicada pelo fato de que Nolasco Junior e De Massaguer (2007), em seus trabalhos, calcularam os parâmetros de resistência térmica nas temperaturas em que foram obtidas curvas de sobreviventes típicas de população com resistência heterogênea (120°C a 125°C), considerando apenas a fração mais resistente e utilizando a Equação 17, diferente do procedimento adotado nesta pesquisa que utilizou a Equação 16 para curvas de sobreviventes não lineares ajustadas por modelo logístico com atraso,  $\tau$ , igual a zero. Pflug (1990) listou valores de D e Z para esporos de *G. stearothermophilus*. Em água para injeção, USP, valor de Z igual 7.8°C, em água contendo dextrose (5%), valor de Z igual a 10.3°C. Pflug (1990) ressaltou que os valores Z listados foram produzidos por diferentes pesquisadores e não podiam ser diretamente comparados pois refletiam muitas diferenças, entre as quais, no método de produção dos esporos, nos meios e sistemas de aquecimento, e no meios de recuperação. Davis *et al.* (1977) reportaram valores de Z para esporos de *G. stearothermophilus* iguais a 7.3°C e 11.8°C em água e leite, respectivamente. O valor de Z obtido nesta pesquisa está de dentro da faixa de valores reportada por outros autores para esse micro-organismo (Pflug 1990; Davies *et al.* 1977).

### FIGURA-3.

Os dados de médias de temperatura das utilidades e do produto à saída de cada secção da unidade Microthermics® UHT/HTST bem como os dados operacionais de vazão de processo e tempos de residência médio e mínimo em cada secção da unidade estão nas tabelas 1-16 do apêndice A. Esses dados foram usados para calcular os perfis térmicos para cada processo, de acordo com Deindoerfer e Humphrey (1959), Figuras-4-7.

FIGURA-4

FIGURA-5

FIGURA-6

FIGURA -7

Os processos térmicos desta pesquisa foram avaliados considerando o tempo de residência mínimo e o tempo de residência médio comparando, para cada caso, o número integral de reduções logarítmicas calculado,  $n_{\text{integral}}\text{-calculado}$ , com o número integral de reduções logarítmicas biológico,  $n_{\text{integral}}\text{-biológico}$ , Tabela-7. Pode-se observar que nos dois casos os valores obtidos de  $n_{\text{integral}}\text{-calculado}$  foram menores que os valores de  $n_{\text{integral}}\text{-biológico}$ , e que utilizando o tempo de residência médio, as diferenças entre esses valores diminuem apresentando um erro relativo de 7.17% contra 22.65% quando o tempo de residência mínimo foi usado, Tabela-7. O esforço de calcular processos utilizando o tempo mínimo é válido para micro-organismos patogênicos por motivos de segurança, o que não é o caso quando se trata de micro-organismos deteriorantes em que o tempo de residência médio fornece melhores estimativas do  $n_{\text{integral}}\text{-biológico}$ . Por outro lado os processos contínuos têm sido reportados como mais eficientes por algumas razões já discutidas quer seja a questão do

aquecimento não isotérmico germinando esporos e liberando células vegetativas de menor resistência térmica abordada por Fernández *et al.*(2001), quer seja a questão da resistência heterogênea detectada na suspensão de esporos utilizada nesta pesquisa por Nolasco Junior e De Massaguer (2007) e mesmo a questão da estimativa do perfil térmico segundo Deindoerfer e Humphrey (1959), Figuras 4 a 7, que pressupõe fontes de aquecimento isotérmicas em seu modelo exponencial de perfil térmico. Pacheco-Sanchez (2005) trabalhando com esporos de *B. cereus* em leite e Tamega Junior (2005), trabalhando com *A. acidoterrestris* em suco de laranja, constataram que os processos contínuos foram mais letais do que indicavam os parâmetros cinéticos obtidos em batelada para os mesmos micro-organismos.

Nos processos 130/C e 130/D não houve sobreviventes contáveis no produto final, sendo que esses processos tiveram concentrações iniciais de inoculo de  $7.40 \times 10^5$  esporos/mL e  $3.03 \times 10^7$  esporos/mL; respectivamente, Tabelas 5 e 6. Por esse motivo, os valores reportados de  $n_{\text{integral-biológico}}$  foram, para o processo 130/C, maior que 5.87 reduções logarítmicas e para o processo 130/D, maior que 7.47 reduções logarítmicas, Tabela-7. Utilizando o tempo de residência médio, o valor obtido de  $n_{\text{integral-calculado}}$  para o processo 130/C, 10.82 reduções logarítmicas, foi muito diferente do obtido para o processo 130/D, 7.55 reduções logarítmicas, Tabela-7. Os tempos de tratamento nos dois processos foram essencialmente iguais e, portanto, não podem explicar as diferenças encontradas, entretanto pequenas diferenças observadas nos dois processos nos parâmetros, temperaturas dos meios de aquecimento, temperaturas de saída do pré-aquecedor, aquecedor e tubo de retenção, Tabelas 9 e 11, resultaram em valores

J, e conseqüentemente em perfis térmicos diferentes, Figura-6, nas secções de aquecimento e retenção, que juntas, são responsáveis pela quase totalidade do efeito letal do processo. As diferenças apontadas durante os processos podem explicar porque os cálculos indicaram que o primeiro processo da repetição, 130/C, teria sido mais rigoroso que o segundo processo da repetição. Esta situação é possível acontecer na unidade piloto utilizada já que o controle das válvulas de entrada de vapor no aquecedor é manual e possível de erro.

O cálculo do processo 130/D, considerando o tempo de residência mínimo, resultou em  $n_{\text{integral}}$ -calculado igual a 6.30 reduções logarítmicas, Tabela-7, que pelo inóculo inicial de  $3.03 \times 10^7$  esporos/mL, Tabela-5, deveria resultar em produto final com sobreviventes contáveis na ordem de  $10^1$  esporos/mL, o que não ocorreu, Tabela-6. Por outro lado, quando se utilizou o tempo de residência médio para calcular o mesmo processo, o resultado obtido, 7.55 reduções logarítmicas, foi coerente com o resultado experimental obtido de não recuperação de sobreviventes no produto, Tabela-7.

Os processos 130/C e 130/D, apesar de representarem condições mais rigorosas de tratamento térmico, quando comparados com os demais processos, resultaram em retenções mínimas de sacarose e de ART de 99.45% e 99.99%; respectivamente, Tabela-6. Os valores de retenção de sacarose foram um pouco menores que os valores observados nos processos 130/A e 130/B, cujos tempos de tratamento foram aproximadamente um terço dos tempos de tratamento dos processos 130/C e 130/D, Tabela-6, Tabelas 5 a 12 do anexo A, mas pode-se afirmar, pelo nível de retenção de ART, que não houve degradação de açúcares durante o processo térmico.

O limite superior da zona de processos térmicos otimizada, Figura-2, não foi ultrapassado, mesmo nas condições mais drásticas dos processos 130/C e 130/D que causaram mais que 7.42 reduções logarítmicas nos esporos de *G. stearothermophilus*, ao contrário, condições mais drásticas poderiam ser admitidas ainda dentro da zona otimizada, como pode ser visto na Figura-2, onde foram plotados os pontos relativos aos processos experimentais executados.

#### TABELA-7.

Industrialmente, o processo térmico foi definido para ser implantado após o decantador, onde foram quantificados grandes grupos microbianos durante amostragem realizada em usinas com diferentes localizações geográficas, clima e característica de capacidade retenção de água no solo (NOLASCO JUNIOR 2005). A concentração máxima de esporos termofílicos foi de  $9 \times 10^1$  esporos/ml de mosto em usina localizada em região quente e úmida e solo com alta capacidade de retenção de água a qual pode requerer um processo térmico mais rigoroso, enquanto um valor de 4 esporos/ml de mosto foi encontrado em usina localizada em região de clima seco e com predominância de solo com baixa capacidade de retenção de água, a qual pode requerer um processo térmico mais brando. Pode ser visto na Figura-2, que a implantação desse processo causaria, teoricamente,  $10^8$  reduções logarítmicas nos *Lactobacillus sp.* Esse elevado valor de  $n_{\text{integral}}$  biológico em importante grupo de contaminantes de fermentações alcoólicas (Gallo e Canhos 1991), foi estimado utilizando os parâmetros cinéticos de destruição térmica de *L. fermentum* reportados por Franchi *et al.* (2003).

## Conclusão

Todos os processos foram adequados no que diz respeito à preservação de açúcares do mosto e considerando necessidade de ter  $n_{\text{integral-biológico}} > 5$ , quando o nível de contaminação do mosto com esporos termofílicos for elevado, os processos 130/C e 130/D serão os mais adequados. Esta pesquisa mostrou que foi possível otimizar a retenção de açúcares durante a esterilização de mostos.

Este fato tem grande impacto na cadeia tecnológica de produção de bioetanol porque fornece as bases para o desenvolvimento de um processo livre de antibióticos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ e à Usina Santa Rosa de Boituva-SP pelo apoio à pesquisa.

## Nomenclatura

$(1-\alpha)$	Fração 2 de sobreviventes, termo-resistente
A	Área de secção transversal ( $\text{m}^2$ )
ART	Açúcares redutores totais
$C_p$	calor específico do produto ( $\text{kcal/kg/C}$ )
D	índice de redução decimal (minutos)
$D^*$	índice de redução decimal a partir de cinéticas não lineares (minutos)

$D_{130^{\circ}\text{C}}$	índice de redução decimal a $130^{\circ}\text{C}$ (minutos)
$D_{135^{\circ}\text{C}}$	índice de redução decimal a $135^{\circ}\text{C}$ (minutos)
$D_i$	diâmetro interno (m)
$D_T$	índice de redução decimal a temperatura $T$ , (minutos)
$F_T$	valor de esterilização a temperatura $T$ (minutos a $T$ )
HTST	alta temperatura baixo tempo (do ingles: high temperature short time)
$J$	Adimensional que engloba propriedades de transporte e físicas, calculado pela (Eq. 10)
$k_1$ e $k_2$	Constantes de destruição térmica das frações 1 e 2 da população de esporos, respectivamente ( $\text{min}^{-1}$ )
$k$	constante de destruição térmica ( $\text{min}^{-1}$ )
$L$	comprimento (m)
$N$	esporos/mL no tempo = $t$
$N_0$	esporos/mL no tempo inicial = $t_0$
$n_{\text{aquecimento}}$	número de reduções decimais no aquecedor
$n_{\text{integral}}$	Número de reduções logarítmicas total do processo
$n_{\text{preaquecimento}}$	número de reduções decimais no preaquecedor
$n_{\text{resfriamento}}$	número de reduções decimais no resfriador final
$n_{\text{retenção}}$	número de reduções decimais na retenção
$^{\circ}\text{Be}$	densidade específica de soluções. Na indústria sucroalcooleira é usada para expressar concentração de soluções de leite de Cao (2g de substância seca/100 ml de solução)

$^{\circ}\text{Brix}$	Medido com refratômetro, expressa a relação entre índices de refração a $20^{\circ}\text{C}$ e a concentração de sólidos solúveis totais (%m/m) de solução aquosa pura de sacarose. Como o açúcar é o principal componente de mostos, xaropes, caldos e méis, a concentração de sólidos solúveis totais é uma boa aproximação da concentração de sacarose, sendo amplamente usada na indústria sucroalcooleira
$Q$	vazão ( $\text{m}^3/\text{s}$ )
$S (N/N_0)$	Fração de esporos sobrevivente no tempo $t$
$t$	tempo (s)
$T_{(H,C)}$	temperatura do produto à entrada ( C )
$T_0$	temperatura do meio ( C )
TDT	Tempo de Morte (destruição) Térmica
$T_i$	Temperatura no incremento de tempo $\Delta t$ ( C )
$T_t$	temperatura em função do tempo ( C )
$U$	coeficiente global de transferência de calor ( $\text{kcal/s/m}^2/\text{C}$ )
UHT	ultra alta temperatura (do inglês: ultra high temperature).
$v$	velocidade média de escoamento (m/s)
$V_{\text{max}}$	velocidade máxima (m/s)
$V_{\text{med}}$	velocidade média (m/s)
$w_p$	fluxo mássico de produto que flui pelo trocador de calor (Kg/s)
$Z$	coeficiente térmico para reduzir o valor $D$ a 10% do seu valor inicial ( $^{\circ}\text{C}$ )
$\Delta t$	Incremento de intervalo de tempo (s)



$\alpha$	fração 1 de sobreviventes, mais termo-sensível
$\gamma$	massa específica (Kg/m <sup>3</sup> )
$\mu$	viscosidade (Pa.s)
$\tau$	medida do atraso letal (min)

## Referências

- AWUAH, G.B.; RAMASWAMY, H.S. e ECONOMIDES, A. 2007. Thermal processing and quality: Principles and overview. Chemical Engineering and Processing 46, 584–602.
- BAYROCK, D.P.; THOMAS, K.C. e INGLEDEW, W.M. 2003. Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. Applied Microbiology and Biotechnology 62, 498–502.
- BEAMAN, T.C. e GERHARDT, P. 1986. Heat Resistance of Bacterial Spores Correlated with Protoplast Dehydration, Mineralization and Thermal Adaptation. Applied and Environmental Microbiology 52(6), 1242-1246.
- BENDER, G.R. e MARQUIS, R.E. 1985. Spore Heat Resistance and Specific Mineralization. Applied and Environmental Microbiology 50(6), 1414-1421.
- BISHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC, K.A e LEATHERS, T.D. 2007. Antimicrobial susceptibility of Lactobacillus species isolated from commercial ethanol plants. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 34, 739-744.
- BURTON, H.; PERKIN, A.G.; DAVIES, F.L. e UNDERWOOD, H.M. 1977. Thermal death kinetics of Bacillus stearothermophilus spores at ultra high temperatures. Journal of Food Technology 12, 149-161.

608 CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 1996. Perdas na fermentação: é  
 609 possível reduzir! Industrial Informa 50, p. 1-2.

610 CLAEYS, W.L.; SMOUT, C.; VAN LOEY, A.M. e HENDRICKX, M.E. 2004. From  
 611 Time Temperature Integrator Kinetics to Time Temperature Integrator  
 612 Tolerance Levels: Heat-Treated Milk. Biotechnology Progress 20, 1-12.

613 DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M.; PERKIN, A.G. e BURTON, H. 1977. Thermal  
 614 death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high  
 615 temperatures. Journal of Food Technology 12, 115-129.

616 DEINDOERFER, F.H. e HUMPHREY, A.E. 1959. Analytical method for calculating  
 617 heat sterilization times. Applied Microbiology 7, 256-264.

618 FERNÁNDEZ, A.; OCIO, M.J.; FERNÁNDEZ, P.S. e MARTÍNEZ, A. 2001. Effect of  
 619 heat activation and inactivation conditions on germination and thermal  
 620 resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. International Journal of  
 621 Food Microbiology 63, 257-264.

622 FRANCHI, M.A.; SERRA, G.E.; SVILOSEN, J. e CRISTIANINI, M. 2003. Thermal  
 623 death kinetics of bacterial contaminants during cane sugar and alcohol  
 624 production. International Sugar Journal 105(1259), 527-530.

625 GALLO, C.R. e CANHOS, V.P. 1991. Contaminantes bacterianos na fermentação  
 626 alcoólica-revisão. Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos 9(4/5), 35-40.

627 GONZALES, C.A. e ROSSELL, C.E. V. 1986. Processos de fabricação de açúcar  
 628 e álcool. Centro de Tecnologia Copersucar RT-207-85/86, 1-10.

629 HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C. e INGLEDEW, W.M. 1997.  
 630 Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during

alcohol fermentation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 18,  
284–291.

KELLY, F.H.C e BROWN, D.W. 1978. Thermal Decomposition and colour  
formation in aqueous sucrose solutions. Sugar Technology Reviews 6(1), 1-  
48.

KWOK, K.C.; LIANG, H.H. e NIRANJAN, K. 2002. Optimizing Conditions for  
Thermal Processes of Soy Milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry  
50, 4834-4838.

LEDERGERBER, U.; REGULA, G.; STEPHAN, R.; DANUSER, J.; BISSIG, B. e  
STÄRK, K.D.C. 2003. Risk factors for antibiotic resistance in campylobacter  
spp. isolated from raw poultry meat in Switzerland. BMC Public Health,  
3(39), 20p. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/39/abstract>>.  
Acesso em 15 set. 2004.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S. e LEGUERINEL, I. 2002. On  
calculating sterility in thermal preservation methods: application of the  
Weibull frequency distribution model. International Journal of Food  
Microbiology 72,107-113.

MARILLER, C. 1951. Distillerie et agricole et industriellelevurerie, sous-produits.  
Paris: Baillière 632p.

NOLASCO JUNIOR, J. 2005. Desenvolvimento de processo térmico otimizado  
para mosto de caldo de cana na fermentação alcoólica, pp. 38-176, Msc  
Thesis, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Faculdade de  
Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo-Brasil.

- NOLASCO JUNIOR, J. e DE MASSAGUER, P.R. 2007. Thermal death kinetics of *B. stearothermophilus* spores in sugarcane must. Journal of Food Process Engineering 30, 625-639.
- PACHECO-SANCHEZ, C. 2005. Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT. PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Faculdade de Engenharia de Alimentos – Campinas, São Paulo-Brasil.
- PERKIN, A.G.; BURTON, H.; UNDERWOOD, H.M. e DAVIES, F.L. 1977. Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures. Journal of Food Technololy 12, 131-148.
- PESSANHA, R.P. e GONTIJO FILHO, P.P. 2001. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online] 53(1), 111-11. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100018&lng=en&nrm=iso). Acesso em 10/01/2010.
- PFLUG, I.J. 1990. Microbiology and Engineering of Sterilization Processes. 7ª edição. Minneapolis, MN/USA: Environmental Sterilization Laboratory.
- PRUITT, K.M. e KAMAU, D.N. 1993. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. Journal of Industrial Microbiology 12, 221-231.
- SHELL, D.J.; DOWE, N.; IBSEN, K.N.; RILEY, C.J.; RUTH, M.F. e LUMPKIN, R.E. 2007. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-

scale corner fiber to ethanol conversion process. Bioresource Technology  
98, 2941-2948.

SHVETS, V.N. 1976. Kinetics of sucrose decomposition reaction during molasses  
sterilization. Izvestiya Vcheknykh Zaudenui, Pishchevaya Tekhnologiya  
4,127-129.

SHVETS, V.N.; SLYUSARENKO, T.P. e PATSERA, A. I. 1972. Heat stability of  
molasses during sterilization. Kharchova Promislovist' (Respublikans'kii  
Mizhvidomchii Naukovo-tekhnichnii Zbirnik) 14, 37-41.

SLYUSARENKO, T.P.; SHVETS, V.N. e KNOGOTKOVA, E.I. 1972. Changes in  
the technological and microbiological parameters of molasses-based diluted  
syrops during sterilization. Izvestiya Vcheknykh Zaudenui, Pishchevaya  
Tekhnologiya 6, 115-118.

TAMEGA JUNIOR, W. P. 2005. Programa para determinação de parâmetros  
cinéticos em sistemas de processamento térmicos contínuos de alimentos.  
Msc Thesis, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Faculdade  
de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo-Brasil.

THAL, L.A. e ZERVOS, J.M. 1999. Occurrence and epidemiology of resistance to  
virginiamycin and streptogramins. Journal of Antimicrobial Chemotherapy  
43,171-176.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J. e  
STOBBERINGH, E.E. 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in  
poultry slaughterers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 49,497-505.

Disponível em:

<<http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>>. Acesso em 10/01/2005.

WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T.M. e FOEGEDING, P.M. 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. *Journal of Food Science* 60(3), 446-450.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. 1991. Características da flocculação de leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. *Revista de Microbiologia* 22(1), 12-16.

Tabela-1. **PARÂMETROS CINÉTICOS DE INATIVAÇÃO TÉRMICA DE *G. stearothermophilus* ATCC1518 EM MOSTO (pH= 6.14, 21.5°BRIX).**

T (°C)	Modelo cinético	$\tau$ (min)	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$k_2$ (min <sup>-1</sup> )	$\alpha$ Fração termo-sensível)
98	Logístico	295.39	0.0194	-----	-----
110	Logístico	45.82	0.1114	-----	-----
120	Resistência heterogênea	-----	1.71 <sup>a</sup>	0.51 <sup>b</sup>	0.996
122,5	Resistência heterogênea	-----	5.50 <sup>a</sup>	1.51 <sup>b</sup>	0.965
125	Resistência heterogênea	-----	16.25 <sup>a</sup>	4.29 <sup>b</sup>	0.9992
130	Linear	-----	13.63	-----	-----

**FONTE: (Nolasco Junior e De Massaguer 2007).**

<sup>a</sup>relativo à fração termo-sensível.

<sup>b</sup>relativo à fração termo-resistente.

**TABELA-2. CONDIÇÕES OPERACIONAIS DOS PROCESSOS TÉRMICOS  
REALIZADOS NOS MOSTOS (21.5BRIX, pH=6.4) E CONFIGURAÇÃO  
UTILIZADA DA UNIDADE MICROTHERMICS® UHT/HTST LAB25DH.**

Processo #*	T (°C) no tubo de retenção	Vazão (L/min)	Configuração utilizada na unidade UHT/HTST LAB 25DH			
125/A	125	1.08	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção EH2	Resfriador final
125/B	125	1.09	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção EH2	Resfriador final
130/A	130	3.02	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção EH2	Resfriador final
130/B	130	3.03	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção EH2	Resfriador final
130/C	130	0.89	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção EH2	Resfriador final
130/D	130	0.89	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção EH2	Resfriador final
135/A	135	3.03	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção Bebidas	Resfriador final
135/B	135	3.02	Pré aquecedor	Aquecedor final	Retenção Bebidas	Resfriador final

\*Os tratamentos aplicados foram identificados pela sua temperatura de ajuste seguido de letra referente à repetição.



**TABELA-3. DADOS DIMENSIONAIS DA UNIDADE MICROTHERMICS®**

**UHT/HTST LAB25DH.**

secções da unidade		L(m)	Di(m)	A(m <sup>2</sup> )
Pré aquecedor	Pré aquecedor	11.58	0.0070	3.89E-05
	conexões	1.94	0.0072	4.12E-05
Aquecedor final	Aquecedor final	11.58	0.0070	3.89E-05
	conexões	2.88	0.0072	4.12E-05
Tubo de Retenção EH2	Tubo de Retenção EH2	5.05	0.010	8.52E-05
	conexões	2.93	0.0072	4.12E-05
Tubo de retenção Bebidas	Tubo de retenção Bebidas	1.39	0.010	8.52E-05
	conexões	2.92	0.0072	4,12E-05
Resfriador final	Resfriador final	11.58	0.0070	3.89E-05
	conexões	2.19	0.0072	4.12E-05

**TABELA-4. PROPRIEDADES FÍSICAS DE TRANSPORTE DO MOSTO A 21,5ºBRIX, NAS TEMPERATURAS DE PROCESSO.**

T(°C)	Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosidade (cp) = mPas	Capacidade calorífica (kj/kgk)
125	1025.1	0.419	3.85
130	1021.1	0.409	3.86
135	1016.9	0.394	3.86

**FONTE:** <http://sugartech.co.za/enqrdata/index.php>

**Tabela- 5. CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS, SACAROSE, GLICOSE, FRUTOSE E ART NOS MOSTOS À ENTRADA DOS PROCESSOS DE TRATAMENTOS TÉRMICOS PROGRAMADOS.\***

Processos	Alimentação da unidade- produto inicial				
	esporos/mL	Sacarose (g/L)	glicose (g/L)	frutose (g/L)	ART (g/L)
125/A	1.50E05	191.49	12.41	12.50	226.48
125/B	7.50E05	188.50	12.50	12.70	223.62
130/A	1.21E06	171.00	7.00	6.80	193.80
130/B	1.17E06	169.01	6.50	6.70	191.11
130/C	7.40E05	183.00	6.80	6.80	206.23
130/D	3.03E07	179.00	6.70	6,80	201.92
135/A	1.56E06	192.00	13.50	13.00	228.61
135/B	1.27E06	191.00	13.00	13.00	227.05

\*Desvio padrão das análises de sacarose, glicose e frutose de 0.77, 0.33 e 0.35 g/l, respectivamente ( triplicata).

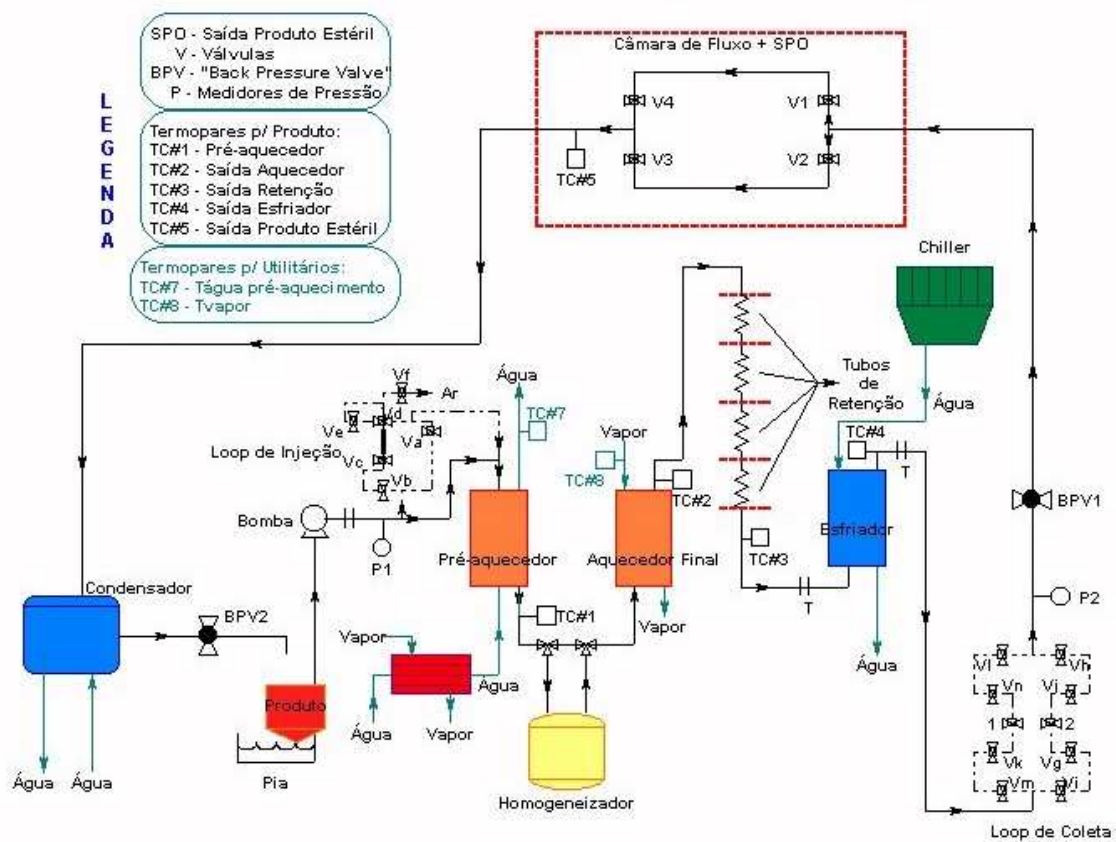
TABELA-6. Concentração de esporos, sacarose, glicose, frutose e ART nos mostos à saída dos processos de tratamentos térmicos programados\*.

Processos	Produto final resfriado						
	esporos/mL	Sacarose (g/L)	% ret. de sacarose	glicose (g/L)	frutose (g/L)	ART (g/L)	% ret. ART
125/A	6.00E02	190.00	99.22	13.10	13.20	226.30	99.92
125/A	1.50E03	187.00	99.20	12.90	12.80	222.54	99.52
130/A	7.00E03	171,00	100.00	6.90	7.00	193.90	100.05
130/B	1.20E04	169.00	99.99	6.50	6.70	191.09	99.99
130/C	<1	182.00	99.45	7.50	7.30	206.38	100.07
130/D	<1	178.50	99.72	7.00	7.00	201.89	99.99
135/A	1.20E03	192.00	100.00	13.00	13.10	228.21	99.83
135/B	1.35E03	190.50	99.74	12.80	12.90	226.23	99.64

\*Desvio padrão das análises de sacarose, glicose e frutose de 0.77, 0.33 e 0.35 g/l, respectivamente ( triplicata).

**TABELA-7. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS TÉRMICOS  
UTILIZANDO O TEMPO DE RESIDÊNCIA MÉDIO E MÍNIMO.**

Processos	$D^*_T$ (min)	$n_{\text{integral-biológico}}$	Tempo de residência médio		Tempo de residência mínimo	
			$n_{\text{integral-calculado}}$	$F_{T(\text{min a } T)}$	$n_{\text{integral-calculado}}$	$F_{T(\text{min. a } T)}$
125/A	0.69	2.40	1.85	1.27	1.54	1.06
125/B	0.69	2.70	2.21	1.52	1.84	1.27
130/A	0.17	2.24	2.28	0.38	1.90	0.32
130/B	0.17	1.99	1.91	0.32	1.59	0.27
135/A	0.05	3.11	3.20	0.16	2.66	0.13
135/B	0.05	3.05	2.98	0.15	2.49	0.12
130/C	0.17	> 5,87	10.82	1.83	9.02	1.52
130/D	0.17	> 7, 47	7.55	1.28	6.30	1.06



1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022 **FIGURA-1. FLUXOGRAMA DA UNIDADE ASSÉPTICA MICROTHERMICS®.**

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

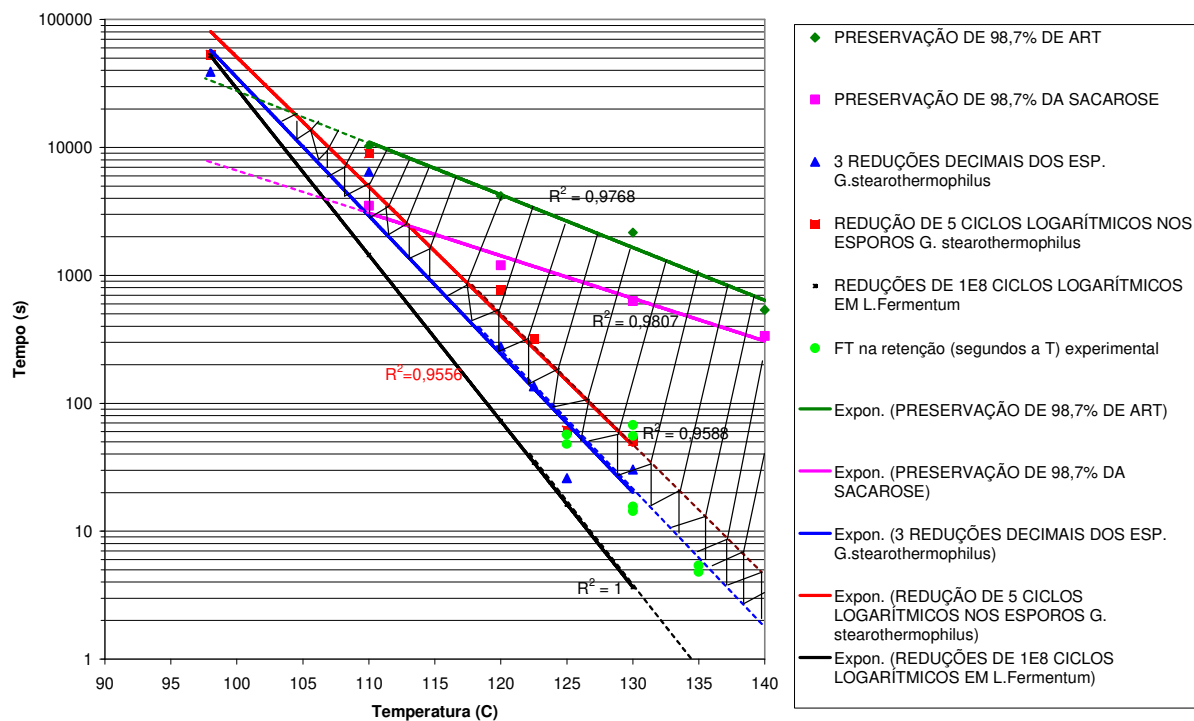
1030

1031

1032

1033

1034





1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073 **FIGURA-2. ZONA DE PROCESSO TÉRMICO GRÁFICO OTIMIZADO PARA**  
1074 **MOSTOS DE CALDO DE CANA E MELAÇO (21.5BRIX, PH=6.4) INDICANDO**  
1075 **DUAS CONDIÇÕES LIMITES INFERIORES .**  
1076 **(Nolasco Junior 2005; Nolasco Junior and De Massaguer 2007).**

1077

1078

1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126

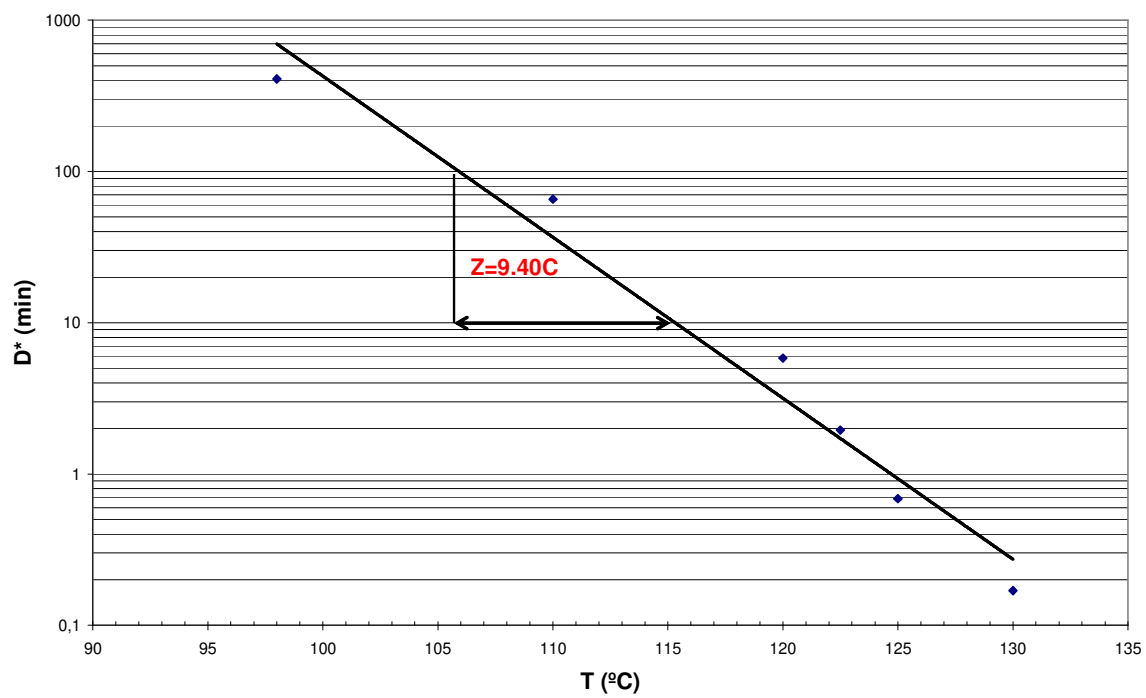
1127

1128

1129

1130

1131



1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141 **FIGURA-3. CURVA FANTASMA TDT PARA OBTENÇÃO DO PARÂMETRO Z**  
1142 **PARA DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE ESPOROS DE *G. stearothermophilus***  
1143 **ATCC 1518 EM MOSTO (pH=6.14, 21.5BRIX) ( $R^2=0.9685$ ,  $F=85.42$ ,**  
1144  **$P=0.000155$ ).**

1145

1146

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

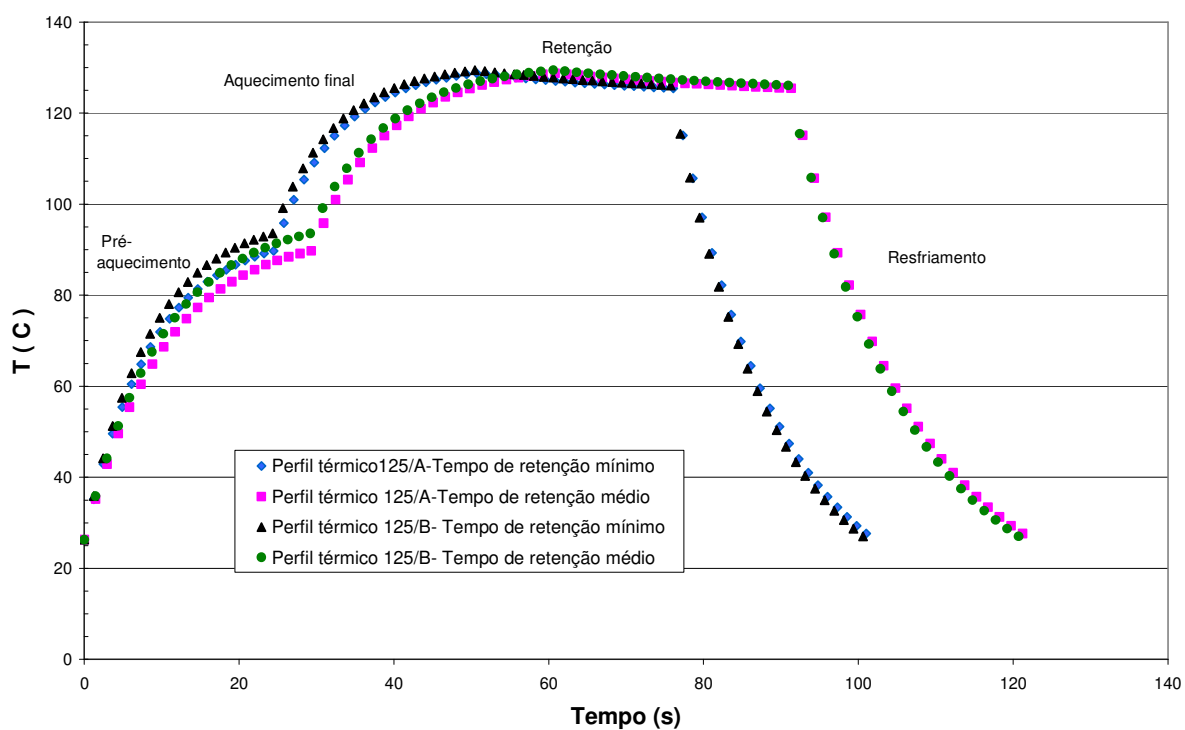
1165

1166

1167

1168

1169



1226  
1227  
1228  
1229  
1230  
1231  
1232  
1233  
1234  
1235  
1236  
1237  
1238  
1239  
1240

1241

1242

1243

1244 **FIGURA-4. PERFIS TÉRMICOS CALCULADOS DE ACORDO COM**  
1245 **DEINDOERFER E HUMPHREY (1959) UTILIZANDO O TEMPO DE RETENÇÃO**  
1246 **MÍNIMO E MÉDIO PARA OS PROCESSOS 125/A E 125/B.**

1247  
1248  
1249  
1250

1251

1252

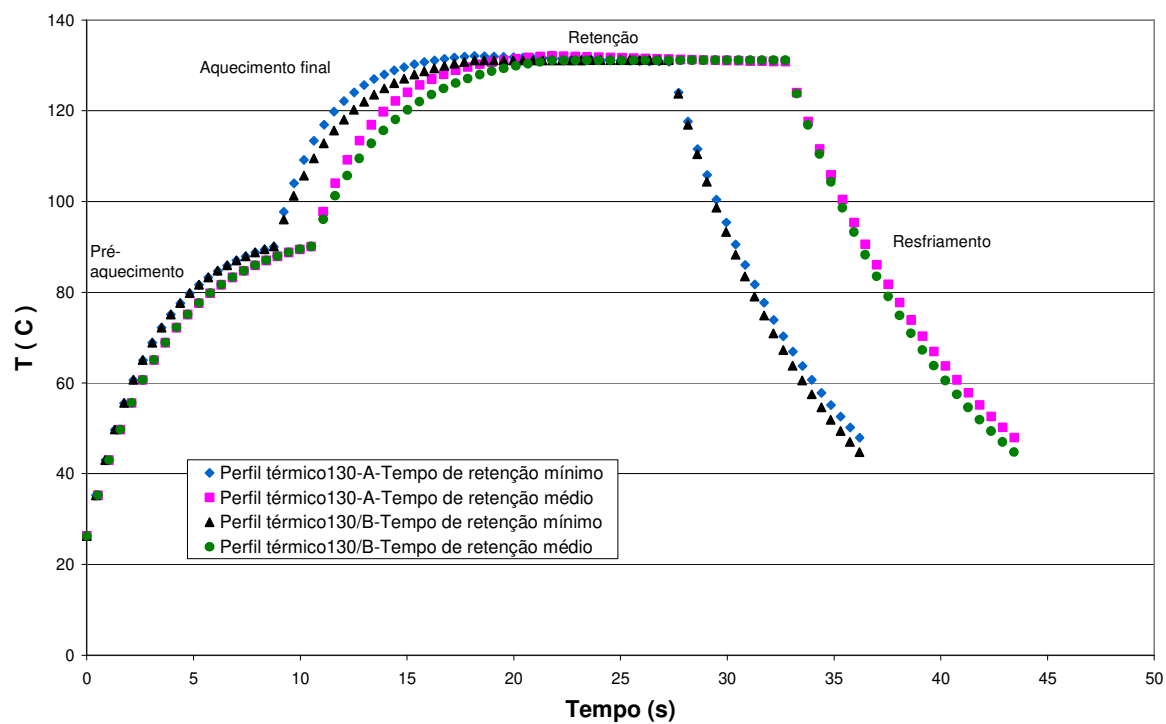
1253

1254

1255

1256

1257  
1258  
1259  
1260  
1261



1318  
1319  
1320  
1321  
1322  
1323  
1324  
1325

1326

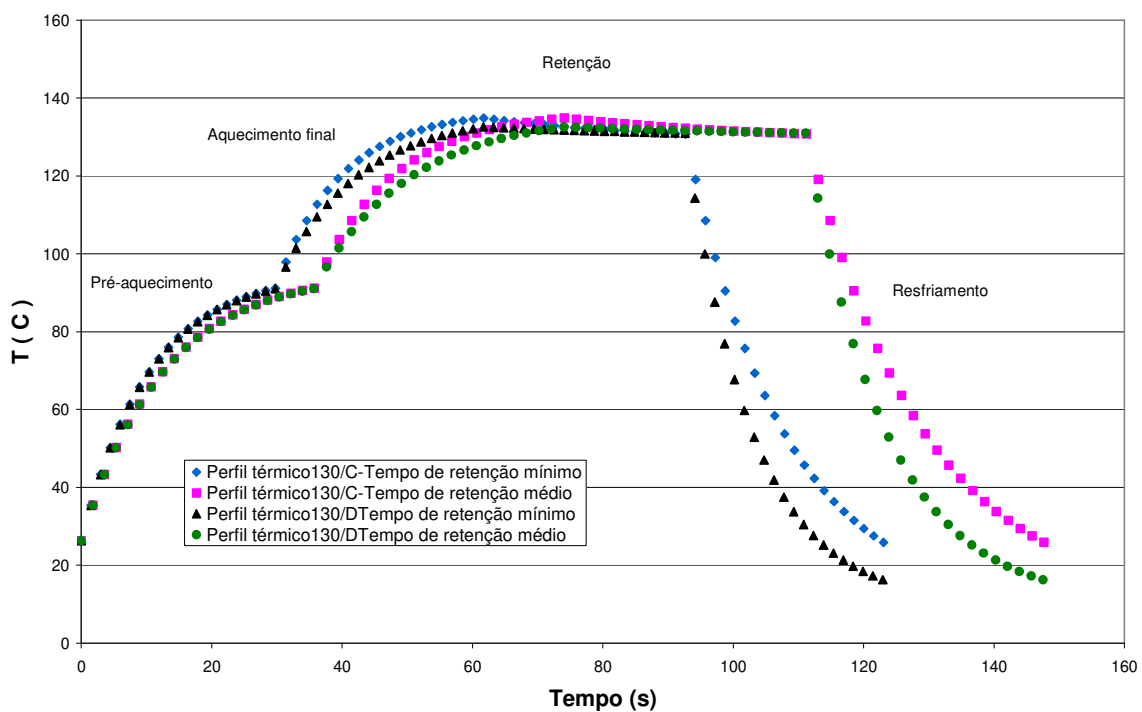
1327

1328

1329

1330

1331 **FIGURA-5. PERFIS TÉRMICOS CALCULADOS DE ACORDO COM**  
1332 **DEINDOERFER E HUMPHREY (1959) UTILIZANDO O TEMPO DE RETENÇÃO**  
1333 **MÍNIMO E MÉDIO PARA OS PROCESSOS 130/A E 130/B.**





1374

1375

1376

1377

1378

1379

1380

1381

1382

1383

1384 **FIGURA-6. PERFIS TÉRMICOS CALCULADOS DE ACORDO COM**  
1385 **DEINDOERFER E HUMPHREY (1959) UTILIZANDO O TEMPO DE RETENÇÃO**  
1386 **MÍNIMO E MÉDIO PARA OS PROCESSOS 130/C 130/D.**

1387

1388

1389

1390

1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

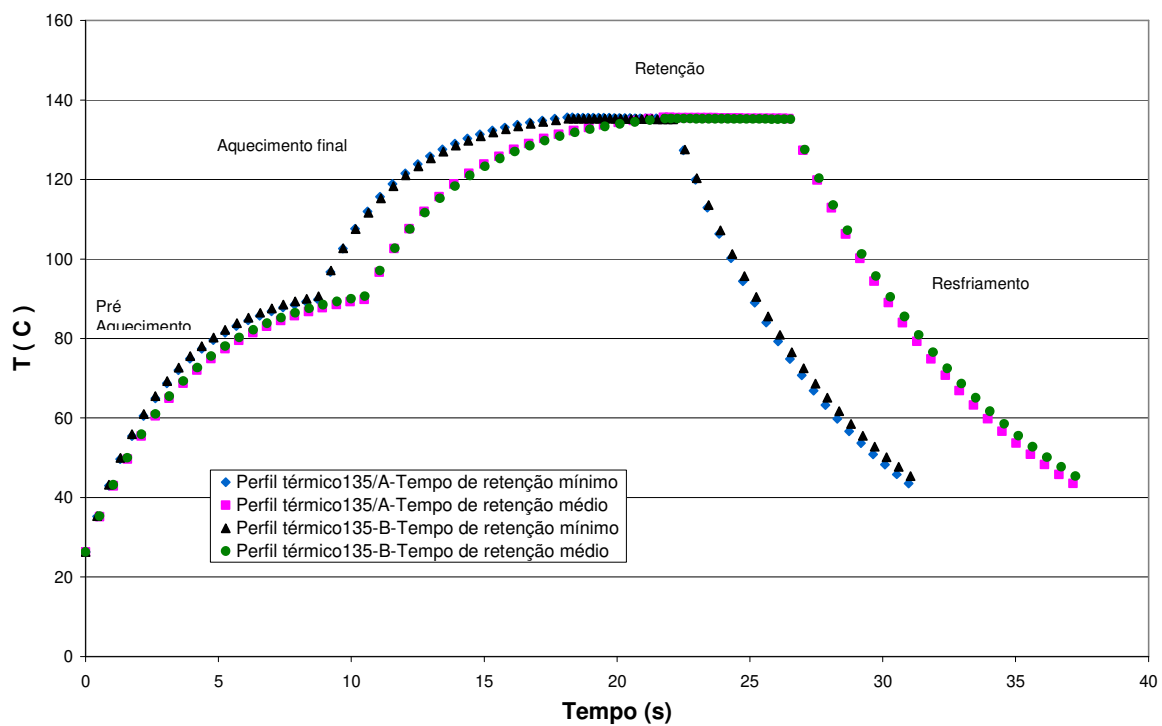
1404

1405

1406

1407

1408



1466  
1467  
1468  
1469  
1470  
1471  
1472

1473

1474

1475

1476

1477

1478

1479

1480 **FIGURA-7. PERFIS TÉRMICOS CALCULADOS DE ACORDO COM**  
1481 **DEINDOERFER E HUMPHREY (1959) UTILIZANDO O TEMPO DE RETENÇÃO**  
1482 **MÍNIMO E MÉDIO PARA OS PROCESSOS 135/A E 135/B.**

1483  
1484  
1485  
1486  
1487  
1488  
1489  
1490  
1491  
1492  
1493  
1494  
1495  
1496  
1497  
1498  
1499  
1500  
1501  
1502  
1503  
1504

1505  
1506  
1507  
1508  
1509  
1510  
1511  
1512  
1513  
1514  
1515  
1516  
1517  
1518  
1519  
1520  
1521  
1522  
1523  
1524  
1525  
1526  
1527  
  
1528  
  
1529  
1530  
1531  
1532  
1533  
1534  
1535  
1536  
1537  
1538  
1539  
1540  
1541  
1542  
1543  
1544  
1545  
1546  
1547  
1548  
1549  
1550  
1551  
1552  
1553  
1554

**APÊNDICE A- Dados operacionais dos processos térmicos para  
cálculo dos perfis térmicos**

**TABELA-1. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO  
DO PROCESSO 125/A COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 30s.**

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	89,72	-0,096261
aquecedor	89,72	128,74	-0,103110
Tubo de retenção	128,74	125,44	-0,032005
resfriador	125,44	27,66	-0,062770
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	93,72		
Meio de aquecimento	130,32		
Meio ao redor do tubo de retenção*	123,44		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	1,08		
densidade (kg/m3)	1025,14		
viscosidade (Pa.s)	0,000419		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	29,34	29,34	
aquecedor	31,50	60,84	
Tubo de retenção	30,49	91,33	
resfriador	29,91	121,24	

**TABELA-2. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO DO PROCESSO 125/A COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 25s.**

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	89,72	-0,115513
aquecedor	89,72	128,74	-0,123732
Tubo de retenção	128,74	125,44	-0,038406
resfriador	125,44	27,66	-0,075324
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	93,72		
Meio de aquecimento	130,32		
Meio ao redor do tubo de retenção*	123,44		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	1,08		
densidade (kg/m3)	1025,14		
viscosidade (Pa.s)	0,000419		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	24,45	24,45	
aquecedor	26,25	50,70	
Tubo de retenção	25,41	76,11	
resfriador	24,93	101,04	

1632

1633

1634

1635

1636

1637

1638 **TABELA-3. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**1639 **DO PROCESSO 125/B COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 30s.**

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	93,54	-0,098561
aquecedor	93,54	129,41	-0,102807
Tubo de retenção	129,41	126,07	-0,024272
resfriador	126,07	27,02	-0,064464

Meio	Temperatura (°C)
Meio de pré aquecimento	97,54
Meio de aquecimento	130,90
Meio ao redor do tubo de retenção*	123,00
Meio de resfriamento	10,00

vazão (l/min)	1,09
densidade (kg/m3)	1025,14
viscosidade (Pa.s)	0,000419

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
Pré-aquecedor	29,22	29,22
aquecedor	31,36	60,58
Tubo de retenção	30,36	90,94
resfriador	29,79	120,73

1657

1658

1659

1660

1661

1662

1663

1664

1665

1666

1667

1668

1669

1670

**TABELA-4. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO DO PROCESSO 125/B COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 25s.**

	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	93,54	-0,118273
aquecedor	93,54	129,41	-0,123369
Tubo de retenção	129,41	126,07	-0,029126
resfriador	126,07	27,02	-0,077357
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	97,54		
Meio de aquecimento	130,90		
Meio ao redor do tubo de retenção*	123,00		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	1,09		
densidade (kg/m3)	1025,14		
viscosidade (Pa.s)	0,000419		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	24,35	24,35	
aquecedor	26,14	50,48	
Tubo de retenção	25,30	75,78	
resfriador	24,82	100,60	



**TABELA-5. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO DO PROCESSO 130/A COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 11s.**

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	90,04	-0,269143
aquecedor	90,04	132,12	-0,348628
Tubo de retenção	132,12	130,79	-0,046931
resfriador	130,79	47,96	-0,108021
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	94,04		
Meio de aquecimento	132,96		
Meio ao redor do tubo de retenção*	128,79		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	3,0247		
densidade (kg/m3)	1021,10		
viscosidade (Pa.s)	0,000409		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	10,51	10,51	
aquecedor	11,28	21,80	
Tubo de retenção	10,92	32,72	
resfriador	10,72	43,44	

**TABELA-6. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO  
DO PROCESSO 130/A COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 9s.**

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	90,04	-0,322972
aquecedor	90,04	132,12	-0,418354
Tubo de retenção	132,12	130,79	-0,056317
resfriador	130,79	47,96	-0,129625
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	94,04		
Meio de aquecimento	132,96		
Meio ao redor do tubo de retenção*	128,79		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	3,0247		
densidade (kg/m3)	1021,10		
viscosidade (Pa.s)	0,000409		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	8,76	8,76	
aquecedor	9,40	18,16	
Tubo de retenção	9,10	27,27	
resfriador	8,93	36,20	

1778

1779

1780

1781

1782

1783

1784 **TABELA-7. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
 1785 **DO PROCESSO 130/B COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 11s.**

1786

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	90,08	-0,269286
aquecedor	90,08	131,12	-0,264581
Tubo de retenção	131,12	131,14	0,001114
resfriador	131,14	44,74	-0,116576

1790

Meio	Temperatura (°C)
Meio de pré aquecimento	94,08
Meio de aquecimento	133,30
Meio ao redor do tubo de retenção*	129,14
Meio de resfriamento	10,00

1794

1795

1796

1797

1798

vazão (l/min)	3,02559
densidade (kg/m3)	1021,10
viscosidade (Pa.s)	0,000409

1799

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
Pré-aquecedor	10,51	10,51
aquecedor	11,28	21,79
Tubo de retenção	10,92	32,71
resfriador	10,71	43,42

1803

1804

1805

1806

1807

1808

1809

1810

1811

1812

1813

1814

1815

1816

1817

1818

1819

1820

1821

1822

1823

1824  
1825  
1826  
1827  
1828  
1829

1830

1831

1832

1833

1834

1835 **TABELA-8. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
1836 **DO PROCESSO 130/B COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 9s.**

1837	Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
1838	Pré-aquecedor	26,30	90,08	-0,323143
1839	aquecedor	90,08	131,12	-0,317498
1840	Tubo de retenção	131,12	131,14	0,001337
1841	resfriador	131,14	44,74	-0,139892
1842	Meio	Temperatura (°C)		
1843	Meio de pré aquecimento	94,08		
1844	Meio de aquecimento	133,30		
1845	Meio ao redor do tubo de retenção*	129,14		
1846	Meio de resfriamento	10,00		

1847	vazão (l/min)	3,02559
1848	densidade (kg/m3)	1021,10
1849	viscosidade (Pa.s)	0,000409

1850	Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
1851	Pré-aquecedor	8,76	8,76
1852	aquecedor	9,40	18,16
1853	Tubo de retenção	9,10	27,26
1854	resfriador	8,93	36,19

1855

1856

1857

1858

1859

1860

**TABELA-9. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO DO PROCESSO 130/C COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 37s.**

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	91,14	-0,079619
aquecedor	91,14	134,85	-0,083563
Tubo de retenção	134,85	130,70	-0,030273
resfriador	130,70	25,87	-0,055682
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	95,14		
Meio de aquecimento	136,70		
Meio ao redor do tubo de retenção*	128,70		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	0,88969		
densidade (kg/m3)	1021,10		
viscosidade (Pa.s)	0,000409		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	35,74	35,74	
aquecedor	38,36	74,10	
Tubo de retenção	37,14	111,24	
resfriador	36,43	147,67	

1895

1896

1897

1898

1899

1900 **TABELA-10. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
 1901 **DO PROCESSO 130/C COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 31s.**

1902

1903

1904

1905

1906

1907

1908

1909

1910

1911

1912

1913

1914

1915

1916

1917

1918

1919

1920

1921

1922

1923

1924

1925

1926

1927

1928

1929

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	91,14	-0,095543
aquecedor	91,14	134,85	-0,100275
Tubo de retenção	134,85	130,70	-0,036328
resfriador	130,70	25,87	-0,066818
Meio	Temperatura (°C)		
Meio de pré aquecimento	95,14		
Meio de aquecimento	136,70		
Meio ao redor do tubo de retenção*	128,70		
Meio de resfriamento	10,00		
vazão (l/min)	0,88969		
densidade (kg/m3)	1021,10		
viscosidade (Pa.s)	0,000409		
Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
Pré-aquecedor	29,78	29,78	
aquecedor	31,97	61,75	
Tubo de retenção	30,95	92,70	
resfriador	30,36	123,06	

1930

1931

1932

1933

1934

1935 **TABELA-11. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
 1936 **DO PROCESSO 130/D COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 37s.**

1937	Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
1938	Pré-aquecedor	26,30	91,03	-0,079651
1939	aquecedor	91,03	132,55	-0,069379
1940	Tubo de retenção	132,55	130,94	-0,015946
1941	resfriador	130,94	16,26	-0,081341
1942	Meio	Temperatura (°C)		
1943	Meio de pré aquecimento	95,03		
1944	Meio de aquecimento	135,68		
1945	Meio ao redor do tubo de retenção*	128,94		
1946	Meio de resfriamento	10,00		
1947	vazão (l/min)	0,89058		
1948	densidade (kg/m <sup>3</sup> )	1021,10		
1949	viscosidade (Pa.s)	0,000409		
1950	Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)	
1951	Pré-aquecedor	35,70	35,70	
1952	aquecedor	38,32	74,03	
1953	Tubo de retenção	37,10	111,13	
1954	resfriador	36,40	147,53	

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971 TABELA-12. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO

1972 DO PROCESSO 130/D COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 31s.

1973

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	91,03	-0,095581
aquecedor	91,03	132,55	-0,083254
Tubo de retenção	132,55	130,94	-0,019136
resfriador	130,94	16,26	-0,097609

1978

Meio	Temperatura (°C)
Meio de pré aquecimento	95,03
Meio de aquecimento	135,68
Meio ao redor do tubo de retenção*	128,94
Meio de resfriamento	10,00

1983

vazão (l/min)	0,89058
densidade (kg/m3)	1021,10
viscosidade (Pa.s)	0,000409

1986

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
Pré-aquecedor	29,75	29,75
aquecedor	31,94	61,69
Tubo de retenção	30,92	92,61
resfriador	30,33	122,94

1990

1991

1992

1993

1994

1995

1996

1997

1998

1999



2000

2001

2002

2003

2004

2005

2006 **TABELA-13. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
 2007 **DO PROCESSO 135/A COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 5s.**

2008

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	89,86	-0,269499
aquecedor	89,86	135,63	-0,274211
Tubo de retenção	135,63	135,35	-0,027703
resfriador	135,35	43,56	-0,123250

2013

Meio	Temperatura (°C)
Meio de pré aquecimento	93,86
Meio de aquecimento	137,82
Meio ao redor do tubo de retenção*	133,35
Meio de resfriamento	10,00

2017

vazão (l/min)	3,03153
densidade (kg/m3)	1016,90
viscosidade (Pa.s)	0,000394

2020

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
Pré-aquecedor	10,49	10,49
aquecedor	11,26	21,75
Tubo de retenção	4,72	26,47
resfriador	10,69	37,16

2025

2026

2027

2028

2029

2030

2031

2032

2033

2034

2035

2036

2037

2038

2039

2040

2041 **TABELA -14. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
 2042 **DO PROCESSO 135/A COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 4s.**

2043

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	89,86	-0,323399
aquecedor	89,86	135,63	-0,329053
Tubo de retenção	135,63	135,35	-0,033244
resfriador	135,35	43,56	-0,147900

2047

Meio	Temperatura (°C)
------	------------------

2048

Meio de pré aquecimento	93,86
-------------------------	-------

2049

Meio de aquecimento	137,82
---------------------	--------

2050

Meio ao redor do tubo de retenção*	133,35
------------------------------------	--------

2051

Meio de resfriamento	10,00
----------------------	-------

2052

--	--

2053

vazão (l/min)	3,03153
---------------	---------

2054

densidade (kg/m3)	1016,90
-------------------	---------

2055

viscosidade (Pa.s)	0,000394
--------------------	----------

2056

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
-------	--------------------	---------------------

2057

Pré-aquecedor	8,74	8,74
---------------	------	------

2058

aquecedor	9,38	18,12
-----------	------	-------

2059

Tubo de retenção	3,93	22,06
------------------	------	-------

resfriador	8,91	30,97
------------	------	-------

2060

2061

2062

2063

2064

2065

2066

2067

2068

2069

2070

2071

2072

2073 TABELA-15. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO

2074 DO PROCESSO 135/B COM TEMPO DE RETENÇÃO MÉDIO DE 5s.

2075

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	90,63	-0,269930
aquecedor	90,63	135,34	-0,261726
Tubo de retenção	135,34	135,17	-0,005655
resfriador	135,17	45,39	-0,117868

2080

Meio	Temperatura (°C)
Meio de pré aquecimento	94,63
Meio de aquecimento	137,80
Meio ao redor do tubo de retenção*	129,00
Meio de resfriamento	10,00

2084

vazão (l/min)	3,02431
densidade (kg/m3)	1016,90
viscosidade (Pa.s)	0,000394

2088

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
Pré-aquecedor	10,51	10,51
aquecedor	11,29	21,80
Tubo de retenção	4,73	26,53
resfriador	10,72	37,25

2094

2095

2096

2097

2098

2099

2100

2101

2102

2103

2104

2105

2106

2107

2108

2109

2110 **TABELA-16. DADOS OPERACIONAIS PARA CÁLCULO DE PERFIL TÉRMICO**  
 2111 **DO PROCESSO 135/C COM TEMPO DE RETENÇÃO MÍNIMO DE 4s.**

2112

Setor	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de Saída (°C)	valor J
Pré-aquecedor	26,30	90,63	-0,323916
aquecedor	90,63	135,34	-0,314072
Tubo de retenção	135,34	135,17	-0,006786
resfriador	135,17	45,39	-0,141441

2117

Meio	Temperatura (°C)
------	------------------

Meio de pré aquecimento	94,63
-------------------------	-------

Meio de aquecimento	137,80
---------------------	--------

Meio ao redor do tubo de retenção*	129,00
------------------------------------	--------

Meio de resfriamento	10,00
----------------------	-------

--	--

vazão (l/min)	3,02431
---------------	---------

densidade (kg/m3)	1016,90
-------------------	---------

viscosidade (Pa.s)	0,000394
--------------------	----------

--	--

Setor	Tempo na etapa (s)	Tempo acumulado (s)
Pré-aquecedor	8,76	8,76
aquecedor	9,40	18,17
Tubo de retenção	3,94	22,11
resfriador	8,93	31,04

2129

2130

2131

# Capítulo 4

**Fermentabilidade de mostos tratados termicamente para produção de  
bioetanol.**

Artigo que será submetido à revista Journal of Food Process Engineering,  
segundo normas de submissão da revista.

**Fermentabilidade de mostos tratados termicamente para  
produção de bioetanol**

**J. Nolasco Junior <sup>1</sup> e P.R. De Massaguer<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup> Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) /Departamento de Ciência de Alimentos, Rua Monteiro Lobato, 80, CP 6121 – CEP 13083-862, Campinas-São Paulo-Brasil.**

**<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP, Faculdade de Engenharia Química (FEQ)/Departamento de Processos Químicos, Rua Albert Einstein, 500, CP 6066, CEP 13083-852 – Campinas-São Paulo Brasil.**

**<sup>1</sup> A quem correspondência deve ser enviada. R Luiz José Mesquita, 407, 13403-855, Piracicaba-SP-BRASIL, fone +55-021-19-33010448, Jonas.nolasco@terra.com.br**

Running Title: INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO TÉRMICO EM MOSTOS NA PRODUÇÃO  
DE BIOETANOL.

## Resumo

Características fermentativas de mostos tratados termicamente segundo os binômios 125°C/30s, 130°C/11s, 130°C/37s e 135°C/5s, para causar 3 reduções logarítmicas nos esporos termorresistentes *G. stearothermophilus* ATCC 1518 com retenção mínima de 98.7% da sacarose e açúcares redutores totais, ART, foram avaliadas utilizando as linhagens de leveduras LNF SA-1 e LNF BG-1, utilizadas industrialmente na produção de etanol. As respostas cinéticas das leveduras, em termos de velocidades específicas máximas de crescimento nos mostos tratados termicamente, diminuíram com o aumento da temperatura de tratamento térmico dos mostos de 0.4187h<sup>-1</sup> para 0.1883h<sup>-1</sup> para LNF SA-1, e de 0.5659h<sup>-1</sup> para 0.0938h<sup>-1</sup> para LNF BG-1. Os tempos de adaptação obtidos para a linhagem LNF SA-1 variaram de 3.1h a 4.97h, mas nos mostos tratados segundo o binômio 135°C/5s foi de 11.17h. Para a linhagem LNF BG-1 os tempos de adaptação obtidos variaram de 5.9h a 6.7h, mas nos mostos tratados na temperatura de 135°C/5s foi de 10.9h. A produtividade das leveduras ficou entre 0.24-0.34 g etanol/g célula/h enquanto que o rendimento em etanol variou de 87.56% a 89.73% sendo que o máximo rendimento da fermentação foi obtido utilizando mosto tratado segundo o binômio 130°C/37s.

## Aplicações Práticas

A manutenção das características fermentativas de mostos submetidos a tratamento otimizado para máxima retenção do seu conteúdo em açúcares, tem grande impacto tecnológico na cadeia de produção de biocombustíveis por conferir, condições para condução do processo de fermentação alcoólica de forma estável, no limite da álcool-tolerância das leveduras industriais, podendo o

processo ser conduzido com maior rendimento alcoólico e consequentemente com menor produção de vinhaça, sem uso de antibióticos, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia de produção de bioetanol combustível.

## **Introdução**

O bioetanol combustível produzido no Brasil é obtido por fermentação de açúcares contidos no mosto de cana-de-açúcar, processo cujas principais características são alta densidade celular, curto tempo de processo (< 8 horas) e reciclo das leveduras com tratamento ácido de acordo com o processo de Melle-Boinot patentes nº 746778/770666 de 1933 (Gonzales e Rossell 1986; Mariller 1951). Outra característica importante é a falta de contenção dos projetos fazendo com que o processo seja conduzido com a presença de contaminantes bacterianos identificados por Gallo e Canhos (1991), frequentemente responsabilizados pelo fato de o setor de fermentação concentrar 30%-60% das perdas totais na indústria, fato que é agravado no Brasil, pela prática do reciclo de células que tende a acumular o problema a cada ciclo (Centro de Tecnologia Copersucar 1996; Trombini *et al.* 1988; Nobre *et al.* 2007; Yokoya e Oliva-Neto 1991). Mesmos grupos contaminantes são encontrados nos agrossistemas milho nos Estados Unidos, beterraba na Europa ou lignocelulósico, denominado de biocombustível de segunda geração os quais são controlados pelo uso intensivo de antibióticos de uso humano ou quimicamente relacionados de grande uso em nutrição animal como aditivos alimentares (Bishoff *et al.* 2007; Schell *et al.* 2007; Centro de Tecnologia Canavieira 2006; Skinner and Leathers 2004; Bayrock *et al.* 2003; Stroppa *et al.* 2000; Klaushofer *et al.* 1998). O uso intensivo de antibióticos tem contribuído para selecionar bactérias nocivas ao Homem, resistentes e



115 tolerantes a antibióticos, a chamada pressão antibiótica, que levou a União  
116 Européia a banir o uso desses produtos como aditivos alimentares na criação  
117 intensiva de animais (Wannmacher 2004; Europa 2003; Ledergerber *et al.* 2003;  
118 Van Den Bogaard *et al.* 2002; Lima *et al.* 1999). Alternativamente, Nolasco Junior  
119 (2005) projetou um processo térmico otimizado para mostos de caldo de cana e  
120 melaço para inativação de contaminantes. A aplicação deste tipo de processo  
121 seria viável sempre que a fermentabilidade dos mostos não fosse afetada  
122 significativamente pela aplicação do calor.

123         No Brasil, os processos de fermentação industriais são avaliados pelo  
124 rendimento para o qual são utilizadas duas metodologias: por balanço de massa  
125 em ART (Finguerut *et al.* 1984) e balanço de massa de subprodutos,  
126 desenvolvido e utilizado no âmbito do sistema Copersucar, que mede as  
127 produções específicas dos subprodutos glicerol, ácidos, leveduras e açúcar  
128 residual não fermentado, todos em relação ao etanol produzido (Finguerut *et al.*  
129 1985; Finguerut e Rossell 1985; César e Finguerut 1992). O Centro de Tecnologia  
130 Canavieira mantém um banco de dados denominado Controle mútuo  
131 agroindustrial com informações de aproximadamente 65 unidades produtoras  
132 associadas, contendo dados de eficiências setoriais na agricultura e no  
133 processamento industrial da cana-de-açúcar para produção de açúcar, bioetanol,  
134 geração de energia e outros produtos. O Controle mútuo agroindustrial fornece  
135 uma excelente caracterização do processo e é utilizado no âmbito dos associados  
136 do Centro de Tecnologia Canavieira como base de comparação. Para esse  
137 trabalho foi utilizado o controle mútuo agroindustrial da safra 2006/05 (Centro de  
138 Tecnologia Canavieira 2006).

Os anos 1990, no Brasil, foram marcados por avanços em modelagem da fermentação e por estudos de dinâmica populacional no processo. Dos estudos cinéticos e modelagem da fermentação (Andrietta 1994; Atalla 2000; Tosetto 2002) surgiram projetos de fermentação contínuos e bateladas alimentadas com reciclo de células (Andrietta 1994), otimizados para operar fora das condições inibidoras de substrato verificadas em concentrações de açúcares a partir de 150g/L, segundo Maiorella *et al.* 1981, das condições de choque osmótico para fugir das respostas metabólicas das leveduras que sempre levam a rendimento menor (Hohmann 2002; Hohmann *et al.* 2007; Devantier *et al.* 2005) e das condições inibidoras do produto formado, o etanol.

A utilização da técnica da cariotipagem eletroforética (Stroppa 2002) para a identificação de leveduras forneceu uma visão da enorme biodiversidade de leveduras no ambiente da fermentação, conforme mostraram com técnicas de taxonomia numérica e testes bioquímicos Cabrini e Gallo (1999) ou Basílio *et al.* (2008) usando biologia molecular, mais recentemente. A cariotipagem permitiu a seleção das primeiras linhagens de *Saccharomyces cerevesiae*, com habilidade de permanência nos processos industriais, entre elas, as linhagens mais amplamente utilizadas na indústria LNF BG-1, LNF SA-1, isoladas pela Copersucar, e LNF PE-2 e LNF CAT-1 isoladas pela Fermentec, embora mesmo essas linhagens tivessem sido substituídas por linhagens selvagens, com características fermentativas indesejáveis, em muitas destilarias onde foram introduzidas (Basso 2006; Amorim 2005; Andrietta *et al.* 1997). O processo térmico de Nolasco Junior (2005) tendo como micro-organismo alvo os esporos de

162 *G. stearothermophilus* será mais que suficiente para inativar também as leveduras  
163 selvagens contaminantes de caldos e mostos.

164 Para o entendimento da dinâmica populacional nas fermentações, Andrietta  
165 *et al.* (1995) propuseram uma diferenciação entre leveduras baseado em  
166 potencial fermentativo, utilizando para isso os parâmetros cinéticos velocidade  
167 específica máxima de crescimento do micro-organismo e as produções  
168 específicas de etanol, massa celular, glicerol e ácidos orgânicos, sempre em  
169 relação ao ART consumido. Com o objetivo de melhorar o desempenho das  
170 fermentações, Andrietta *et al* (1999) desenvolveram uma metodologia de  
171 classificação de leveduras quanto a sua capacidade fermentativa, levando-se em  
172 conta as características cinéticas e parâmetros de rendimento e produtividade das  
173 linhagens, em mosto sintético padrão contendo glicose (150 g/L) suplementado  
174 com extrato de levedura (6 g/L) e sais minerais. Com essa metodologia os autores  
175 avaliaram o grau de heterogeneidade da população de leveduras em  
176 fermentações industriais quanto as suas respectivas capacidades fermentativas e  
177 recomendaram que as partidas dos processos fossem feitas com fermentos  
178 selecionados nas próprias unidades na safra anterior, utilizando as linhagens  
179 melhor classificadas.

180 A presente pesquisa teve por objetivo avaliar a fermentabilidade de mostos  
181 tratados termicamente medindo o crescimento das linhagens de leveduras LNF  
182 SA-1 e LNF BG-1 durante a fermentação, o rendimento e produtividade do  
183 processo e comparando com o desempenho de unidades industriais onde esses  
184 tratamentos térmicos ainda não são aplicados, utilizando para isso, informações  
185 de controle de processos das mesmas.

## Material e Métodos

### Micro-organismos utilizados

Foram utilizadas duas linhagens de leveduras usadas na produção industrial de bioetanol no Brasil: *Saccharomyces cerevisiae* LNF SA-1 e *Saccharomyces cerevisiae* LNF BG-1. A primeira foi isolada de um processo de fermentação contínua da Usina Santa Adélia de Jaboticabal-SP e a última de um processo de fermentação tipo batelada alimentada da Usina Barra Grande de Lençóis Paulista-SP. As duas linhagens foram isoladas e identificadas por cariotipagem eletroforética (Stroppa 2002) pela Copersucar (Basso 2006) e são comercializadas pela Empresa LNF Latino Americana na forma seca ativa, que cedeu amostra para essa pesquisa (LNF 2010).

### Mosto utilizado

Mostos a 22.5ºBrix e pH=6.4 preparados e tratados termicamente conforme descrito em Nolasco Junior e De Massaguer (2010), estocados a 4ºC em câmara, foram utilizados nos ensaios de fermentabilidade desta pesquisa. Previamente aos testes de fermentabilidade, os mostos estocados em câmara fria, foram avaliados microbiologicamente por incubação de 3 a 5 amostras por 48 horas e 30ºC, seguida de esgotamento em triplicata em Agar Padrão para Contagem (PCA-Oxoid®), Agar de Man, Rogosa & Sharp (MRS-Oxoid®) e Triptona Soja Agar (TSA- Oxoid®) por 48h a 30ºC.

**Estabelecimento dos parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em mosto,  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $\lambda$ ,  $N_{\text{final}}$  e cálculo do rendimento e da produtividade.**

Para ativar as culturas, dois tubos inclinados com meio de cultura Agar Batata Dextrose (PDA, Oxoid®) e semeados com cada uma das linhagens de leveduras LNF SA-1 e LNF BG-1 foram incubados a 32°C por 24h. Um deles foi utilizado para repique das culturas a fim de se trabalhar com culturas jovens e o outro usado para ressuspender a cultura com 50 mL de água estéril e formar a suspensão de levedura para os ensaios de crescimento (Andrietta *et al.* 1999).

Os testes de crescimento foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL esterilizados em autoclave a 121°C/15min secos e resfriados, em duplicata, para cada linhagem de levedura testada. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha, que possuíam um orifício preenchido com algodão para permitir a saída do gás carbônico produzido durante a fermentação. Foi transferido para cada Erlenmeyer, assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100, aproximadamente 100 ml de mosto (22.5°Brix, pH 6.4). Os frascos foram inoculados com 10 mL de suspensão de leveduras. Imediatamente após a inoculação foram retiradas amostras de cada frasco para a leitura da densidade ótica inicial ( $t=0$ ). Os frascos foram incubados em shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J./EUA, Series 25) a 32°C e 150 rpm. O crescimento da levedura foi por determinação da densidade ótica, a 600 nm, em espectrofotômetro (Beckman®, Fullerton-CA/US, modelo DU 640B) em intervalos de tempos regulares de forma a caracterizar graficamente cada uma das fases de crescimento até atingir a fase estacionária. Para calibração do espectrofotômetro,

com mosto sem inóculo, foi utilizado o fator de diluição igual a cem (100), devido à cor marrom avermelhada intensa, característica de mostos de caldo de cana e melaço concentrados para estabilização da leitura em zero. As análises de densidade ótica no meio de crescimento foram submetidas ao mesmo fator de diluição. As curvas de crescimento foram construídas, a partir dos dados experimentais, em duplicata, e modeladas conforme o modelo de Baranyi e Roberts (1994), Equação 1, utilizando o software DMFIT 2.1, desenvolvido pelos autores e disponível sem custo em <http://www.ifr.ac.uk/safety/DMFit>, para estimar taxas de crescimento específico, tempo de adaptação (  $\lambda$  ) e tamanho da população máxima ( $N_{final}$ ). O parâmetro cinético estabelecido a partir do ajuste do logaritmo da razão densidade ótica /densidade ótica inicial vs o tempo, foi a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) que reflete a adaptação do micro-organismo no meio.

$$N(t) = N_0 + \mu_{max} A(t) - \ln \left( 1 + \frac{e^{\mu_{max} A(t)} - 1}{e^{N_{final} - N_0}} \right) \quad (1)$$

Os experimentos de determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento foram identificados por número e letra correspondente à identificação do processo de tratamento térmico dos mostos (Nolasco Junior e De Massaguer 2010), seguido do número da repetição do ensaio, Tabela-1. Nesta tabela pode-se encontrar a correspondência entre a identificação dos experimentos e as condições de processo térmico dos mostos utilizados, em termos de temperatura e médio de retenção.

TABELA-1.

**Parâmetros de rendimento e produtividade**

Foram determinados os seguintes parâmetros de rendimento ou produções específicas de produtos formados em relação ao consumo de substrato, ART: produção específica de etanol (Eq.2), produção específica de levedura (Eq.3) e produção específica de glicerol (Eq.4). Também foram calculadas a produtividade celular em etanol (Eq.5) e a conversão de substrato (Eq.6) (Andrietta *et al.* 1995; Andrietta *et al.* 1999).

$$Y_{p/s} = \frac{E_{tan\ ol_{produzido}}}{ART_{consumido}} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = \frac{Levedura_{produzida}}{ART_{consumido}} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (3)$$

$$Y_{g/s} = \frac{Glicerol_{produzido}}{ART_{consumido}} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (4)$$

$$Pr\ od = \frac{E_{tan\ ol_{produzido}}}{Levedura_{produzida} \times tempo_{fermentação}} \left( \frac{g}{g * h} \right) \quad (5)$$

$$CONV = 100 \times \frac{ART_{consumido}}{ART_{inicial}} (\%) \quad (6)$$

O rendimento fermentativo foi calculado pelo método dos subprodutos formados na fermentação ou simplesmente rendimento por subprodutos, Rsp, (Eq.7) proposto e utilizado tradicionalmente desde os anos 80, no âmbito das Usinas cooperadas do sistema Copersucar (Finguerut *et. al* 1985; Finguerut e Rossell 1985; César e Finguerut 1992). O rendimento calcula as produções específicas, em relação ao etanol produzido, dos subprodutos levedura (Eq. 8),

açúcares não consumidos (Eq. 9), ácidos (Eq. 10) e glicerol (Eq. 11). O CO<sub>2</sub> produzido é calculado estequiometricamente em função do etanol produzido e está incluído na constante 1,01 da equação 7. De acordo com os autores, os subprodutos citados seriam aqueles com significância para serem monitorados.

$$R_{sp} = \frac{100}{(1.01 + 1.19 * K_{Levedura} + 0.511 * (K_{ART} + K_{Ácido} + K_{Glicerol}))} (\%) \quad (7)$$

$$K_{Levedura} = \frac{Levedura_{produzida}}{E \tan ol_{produzido}} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (8)$$

$$K_{ART} = \frac{ART_{residual}}{E \tan ol_{produzido}} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (9)$$

$$K_{Ácido} = \frac{Acidez_{produzida}}{E \tan ol_{produzido}} \left( \frac{g}{g} \right) \quad (10)$$

$$K_{Glicerol} = \frac{Glicerol_{produzido} (g)}{E \tan ol_{produzido} (g)} \quad (11)$$

A conversão do parâmetro industrial K<sub>Levedura</sub> a μ<sub>max</sub>, pode ser feita a partir da (Eq. 12) (Nota do Autor).

$$\mu_{max} = \frac{K_{Levedura} \times d_{E \tan ol}}{Pr od_{Ind} \times C \times f \times 24} (h^{-1}) \quad (12)$$

Também foi calculado o rendimento baseado na Equação de Gay-Lussac, R<sub>G-L</sub>, (Eq.13) que considera apenas a formação de etanol e CO<sub>2</sub> a partir da molécula de glicose.

$$R_{G-L} = 100 * \frac{Y_{P/S}}{0.511} (\%) \quad (13)$$



## **Preparo do inóculo para os ensaios de fermentação de mosto de caldo de cana e melaço**

Todos os ensaios foram realizados com repique de 24h das culturas das linhagens de leveduras LNF SA-1 e LNF BG-1 mantidas em tubos inclinados de Agar Batata Dextrose (PDA, Oxoid®) e incubadas previamente a 32°C por 24h (Andrietta *et al.* 1995; Andrietta *et al.* 1999). Após esse período o crescimento dos tubos inclinados foi ressuspenso em 50 ml de água estéril para ser usado nos ensaios de fermentação. Foi determinada a massa seca do inóculo por secagem, em placa, de aproximadamente 10 ml da suspensão de inóculo em estufa a 70°C, medindo o peso inicial da suspensão até peso final constante. Dessa forma foi determinada a concentração de células em massa seca no inóculo (CCI) e expresso em gramas de células em massa seca por grama de inóculo.

## **Fermentação**

A avaliação da fermentabilidade dos mostos tratados termicamente, conforme descrito por Nolasco Jr. e de Massaguer (2010), a partir das linhagens de leveduras selecionadas, foi realizada através de adaptação da metodologia desenvolvida por Andrietta *et al.* (1999) para classificação de leveduras industriais pela capacidade fermentativa. Outra adaptação do método foi o aumento do tempo de fermentação para 52h, já que a concentração de açúcares redutores totais do mosto desta pesquisa foi aproximadamente 47% maior que a utilizada na metodologia original. Também foi determinada a produção específica de glicerol (Yg/s) não utilizado na metodologia original.

Os testes de fermentação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL em triplicata para cada linhagem de levedura testada. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha, contendo um orifício preenchido com algodão para permitir a saída do gás carbônico produzido durante a fermentação, sendo esterilizados em autoclave a 121°C/15min, secos, resfriados e então pesados em balança eletrônica e registrados (P1) para uso nos cálculos envolvidos. Foi transferido assepticamente, em câmara de fluxo laminar, para cada Erlenmeyer, aproximadamente 100 ml do mosto tratado termicamente sendo os Erlenmeyers fechados e pesados novamente para registro de seus pesos (P2). A concentração de açúcares redutores totais no mosto foi determinada de acordo com Lane e Eynon (1923). Os frascos foram então inoculados com 10 mL de suspensão de cada linhagem de levedura de concentração previamente determinada, pesados novamente para determinar a quantidade de inóculo inicial e tiveram seus pesos registrados (P3). Os frascos foram incubados em shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J./EUA, Series 25) a 32°C e 150 rpm por 52 horas. Terminado o tempo de fermentação, os frascos foram pesados para se determinar a quantidade de gás carbônico produzido, sendo os pesos registrados (P4). As amostras (40g/frasco) foram centrifugadas (Sorval Instruments Dupont, Delaware, Washington/EUA, modelo RC5C, rotor GSA10) a 8400xg por 5 minutos a temperatura de 32°C. Os centrifugados foram lavados com água estéril e recentrifugados por três vezes. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri, previamente taradas, e secos em estufa a 70°C até peso constante. Dessa forma se determinou a concentração de células em massa seca no vinho fermentado e expresso em g de células (massa seca)/g de vinho e registrados

como CCV. Os sobrenadantes da primeira centrifugação dos vinhos fermentados foram utilizados nas determinações de concentração de etanol (ABNT 1980), por destilação da amostra seguida de leitura em densímetro eletrônico (ANTON PAR®, Graz-Austria, modelo DMA 4500), de açúcares redutores totais (Somogy 1945; Nelson 1944) e glicerol (Sigma Procedure-337 1995). Com estes dados foram calculados as produções de etanol (Eq.14), glicerol (Eq.15), levedura (Eq.16) e o consumo de ART (Eq.17 a Eq. 19).

$$E\ tan\ ol_{produzido}\ (g) = \frac{(P4 - P1)}{100} \times [e\ tan\ ol]_{vinho} \quad (14)$$

$$Glicerol_{produzido}\ (g) = \frac{(P4 - P1)}{100} \times [glicerol]_{vinho} \quad (15)$$

$$Levedura_{produzida}\ (g) = (P4 - P1) \times CCV - (P3 - P2) \times CCI \quad (16)$$

$$ART_{inicial}\ (g) = \frac{(P2 - P1)}{100} \times [ART]_{vinho} \quad (17)$$

$$ART_{final}\ (g) = \frac{(P4 - P1)}{100} \times [ART]_{vinho} \quad (18)$$

$$ART_{consumido}\ (g) = ART_{inicial} - ART_{final} \quad (19)$$

## Resultados e Discussão

Os parâmetros cinéticos velocidade máxima de crescimento, tempo de adaptação e população máxima atingida, obtidos para as linhagens de levedura testadas nos experimentos de crescimento celular podem ser encontrados nas Tabelas 2 e 3. As curvas de crescimento obtidas para as duas linhagens testadas em mostos tratados com o binômio 125°C/30s, Figuras 1 e 2, binômio 130°C/37s, Figuras 3 e 4, e 135°C/5s, Figuras 5 e 6, foram selecionadas para ilustrar os experimentos de obtenção dos parâmetros cinéticos de crescimento.

TABELA-2

TABELA-3

FIGURA-1

FIGURA-2

FIGURA-3

FIGURA-4

FIGURA-5

FIGURA-6

Os valores médios dos parâmetros cinéticos obtidos foram submetidos ao teste estatístico de t-student para avaliação de significância dos valores considerando os quatro tratamentos térmicos, Tabelas 4-7.

Os valores médios de velocidade específica de crescimento para a linhagem LNF BG-1 decresceram com o aumento da temperatura de tratamento térmico do mosto utilizado, variando de  $0.5659 \text{ h}^{-1}$  quando utilizado mosto submetido ao binômio de tratamento térmico de  $125^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ , para  $0.0938 \text{ h}^{-1}$ , quando utilizado mosto submetido ao binômio de tratamento térmico de  $135^{\circ}\text{C}/5\text{s}$ , sendo estatisticamente diferentes entre tratamentos, com  $p < 0.05$ , Tabela-4. Para a linhagem LNF SA-1 as velocidades máximas de crescimento obtidas também decresceram com o aumento da temperatura de tratamento térmico do mosto variando de  $0.4187\text{h}^{-1}$  quando utilizado mosto submetido ao binômio de tratamento térmico de  $125^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ , para  $0.1883\text{h}^{-1}$ , quando utilizado mosto submetido ao binômio de tratamento térmico de  $135^{\circ}\text{C}/5\text{s}$ , sendo também estatisticamente

diferentes entre si, a  $p < 0.05$ , com exceção dos valores obtidos quando foram utilizados os mostos submetidos aos binômios 125°C/30s e 130°C/11s, Tabela-5.

Os valores de  $N_{\text{final}}$  reportados são os logaritmos decimais das razões entre a densidade ótica final e inicial ou em outras palavras, exprime a relação entre a população final e inicial obtido em cada ensaio para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento, de cada uma das linhagens de levedura, em cada mosto avaliado. A população final, para a linhagem LNF BG-1, ao contrário da velocidade específica máxima de crescimento, não diminuiu com o aumento da temperatura como seria de esperar, porque os valores médios não apresentaram diferença significativa a  $p < 0.05$ , Tabela-4. Valores elevados dos desvios-padrão obtidos para os valores médios de  $N_{\text{final}}$  nos experimentos 130/A/B, 135/A/B influenciaram os resultados de forma que as populações finais nos experimentos 125/A/B, 130/A/B e 135/A/B não foram significativamente diferentes a  $p < 0.05$ . Experimentalmente foi observado algum ruído de leitura durante a calibração do espectrofotômetro. Após a diluição pelo fator de 100, as leituras de densidade ótica do mosto sem inóculo, variavam entre 0.0000 a 0.0003, sendo utilizado 0.0001 quando o valor 0.0000 foi obtido, para evitar a divisão por zero no quociente  $DO_{\text{final}}/DO_{\text{inicial}}$  mas não evitou maior variabilidade em certos casos. Em vista disso, é possível afirmar que, especificamente para o parâmetro  $N_{\text{final}}$ , contagem por plaqueamento ou microscopia seria mais recomendável. Para a linhagem LNF BG-1, nos ensaios utilizando mostos submetidos aos tratamentos mais rigorosos o valor médio obtido da relação  $DO_{\text{final}}/DO_{\text{inicial}}$  foi  $\geq 89.51$  e nos ensaios utilizando mostos submetidos aos tratamentos mais brandos

DO<sub>final</sub>/DO<sub>inicial</sub> foi  $\geq 288$ , Tabela-4. Respectivamente, para a linhagem LNF SA-1, os valores médios obtidos foram  $\geq 18.78$  e  $\geq 740$ , Tabela-5.

Os parâmetros de tempo de adaptação obtidos para as duas linhagens testadas nesta pesquisa utilizando mosto submetido ao processo térmico representado pelo binômio 135°C/5s, 11.1712h para LNF SA-1 e 10.8773h para LNF BG-1, foram significativamente diferentes e maiores que os valores obtidos nos demais tratamentos que variaram entre 3.0995h e 4.9693h para LNF SA-1 e 5.9158h e 6.6541h para LNF BG-1, Tabelas 4 e 5. As duas linhagens de leveduras apresentaram menor velocidade específica de crescimento máximo e maior tempo de adaptação nos mostos tratados com o binômio de temperatura mais elevada 135°C/5s. Isto pode ser indicativo de alguma reação que acabou por indisponibilizar algum nutriente mineral essencial para as leveduras, já que os açúcares foram preservados acima do nível mínimo (Nolasco Junior e De Massaguer 2010). É sabido que a precipitação de metais ocorre em pHs alcalinos (> 8) e seria possível que a temperatura mais elevada de 135°C tivesse provocado a precipitação de algum cátion com importante função nutricional para as leveduras.

#### TABELA-4

#### TABELA-5

Na comparação entre as duas linhagens, as velocidades máximas de crescimento obtidas não foram significativamente diferentes, a  $p < 0.05$ , nos

mostos submetidos aos tratamentos térmicos mais brandos, 125°C/30s e 130°C/11s, mas foram significativamente diferentes, a  $p < 0.05$ , nos mostos submetidos aos tratamentos mais drásticos, 130°C/37s e 135°C/5s, sendo que os valores obtidos para a linhagem LNF SA-1 foram maiores que os valores obtidos para a linhagem LNF BG-1, Tabela-6. Já os tempos de adaptação obtidos para as duas linhagens foram significativamente diferentes, a  $p < 0.05$ , nos mostos submetidos aos tratamentos térmicos mais brandos, 125°C/30s e 130°C/11s, com menores valores para a linhagem LNF SA-1 enquanto que nas condições mais drásticas, 130°C/37s e 135°C/5s, os tempos de adaptação obtidos das linhagens não foram significativamente diferentes, a  $p < 0.05$ , Tabela-7. Alvarenga (2008), em sua pesquisa em temperaturas de fermentação variando entre 25°C-32°C utilizando a linhagem de levedura CCT0759 e também mosto de caldo de cana e melaço a 21.5Brix e pH 6.4 esterilizado em autoclave a 121°C/40min, reportou tempos de adaptação entre 5.76h a 8.70h, comparáveis com os obtidos nesta pesquisa nas condições mais brandas para a linhagem LNF BG-1, e velocidades máximas de crescimento menores, entre 0.16h<sup>-1</sup> a 0.229h<sup>-1</sup>. A autora ajustou o inóculo para seus ensaios de fermentação em 10<sup>6</sup> leveduras/ml o que representa fermentação de alta densidade celular em que as velocidades máximas de crescimento diminuem.

#### TABELA-6

#### TABELA-7

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação de fermentabilidade dos mostos tratados termicamente, Tabelas 1-8 do Anexo 1, foram convertidos em parâmetros usados pela indústria sucroalcooleira para avaliar os processos industriais de fermentação, Tabelas 8-9 e comparados com os dados industriais de processos da safra 2005/06 através do banco de dados controle mútuo agroindustrial, Tabelas 1-4 do Anexo-2 (Centro de Tecnologia Canavieira 2006). Os valores de rendimento por subprodutos obtidos nesta pesquisa (Eq.7) variaram de 87.56% a 89.73%, Tabela-8, 0.64 a 2.81 pontos percentuais menores do que o valor médio de 90.37% reportado pelo controle mútuo agroindustrial para fermentações industriais durante a safra 2005/06, Tabela-4 do Anexo-2. De acordo com a fórmula para cálculo do rendimento por subprodutos (Eq.7), rendimentos máximos são obtidos com valores mínimos de  $K_{\text{Ácido}}$ ,  $K_{\text{Glicerol}}$ ,  $K_{\text{Levedura}}$  e  $K_{\text{ART}}$ , sendo que o parâmetro  $K_{\text{Levedura}}$  tem peso maior que os demais parâmetros no cálculo do rendimento. Os valores de  $K_{\text{Levedura}}$  obtidos nessa pesquisa variam de 0.0687g/g a 0.08g/g, Tabela-8, e foram muito maiores que o valor médio encontrado no controle mútuo agroindustrial, 0.0428g/g, Tabela-1 do Anexo-2, sendo o principal parâmetro responsável pelo rendimento menor encontrado nesta pesquisa. Para se ter uma idéia do peso do  $K_{\text{Levedura}}$  no resultado do rendimento, se fosse adotado o valor de  $K_{\text{levedura}}$  industrial de 0.0428g/g, e mantidos os demais valores de K's obtidos nesta pesquisa, Tabela-8, o rendimento da fermentação calculado pela (Eq.7) nos experimentos dessa pesquisa seria igual a 91.11% ou 0.74 pontos percentuais acima do rendimento médio industrial reportado no controle mutuo referente à safra de 2005/06, Tabela-4 do Anexo-2.



## TABELA -8

Algumas características dos processos industriais e dos testes de fermentabilidade explicam as diferenças na produção específica de biomassa,  $K_{\text{Levedura}}$ , encontrados nos dois processos. Enquanto os processos industriais brasileiros de fermentação alcoólica são conduzidos em anaerobiose e com alta densidade celular porque adotam o processo de Melle-Boinot (Gonzales e Rossell 1986; Mariller 1951), cuja principal característica é o reciclo de células, os testes de fermentabilidade, nesta pesquisa, foram conduzidos como bateladas puras em Erlenmeyers de 250 mL com volume útil de 100 mL, tampados com rolha de borracha com orifício preenchido com algodão e agitação controlada em 200rpm o que confere difusão de ar através do meio, e baixa densidade celular. O rendimento em biomassa por substrato consumido em aerobiose é cerca de 4 vezes maior que o rendimento obtido em anaerobiose, 0.57 C-mol de biomassa/C-mol de glicose e 0.14 C-mol de biomassa/C-mol de glicose e, respectivamente (Heijnen and Dijken 1991).

A alta densidade celular associada ao reciclo de célula, anaerobiose e modo de operação contínuo ou batelada alimentada, característicos dos processos de fermentação alcoólica brasileiros, resultam em velocidade muito baixa de crescimento da população de leveduras o que leva a valores de  $K_{\text{levedura}}$  mínimos e maiores rendimentos. Os modelos cinéticos de crescimento microbiano em função de fatores inibidores como concentração celular, concentração de substrato e de produto formado explicam a condição de menor produção de biomassa encontrada no processo brasileiro de fermentação alcoólica (Andrietta

1994; Atalla 2000; Tosetto 2002). A título de comparação, os valores de  $K_{\text{levedura}}$  industriais poderiam ser convertidos em parâmetros de velocidade de reprodução  $\mu_{\text{max}}$ , (Eq.12) usando parâmetros nem todos disponíveis como o parâmetro de projeto de instalações, produtividade industrial. Entretanto é tipicamente considerado um valor industrial de  $\mu_{\text{max}}$  de  $0.0053 \text{ h}^{-1}$  nas condições brasileiras de fermentação (Nota do autor). Esse é muito inferior aos valores de  $\mu_{\text{máx}}$  obtidos em qualquer dos experimentos de cinética de crescimento realizados nessa pesquisa.

Maiores valores de rendimentos fermentativos por subprodutos foram obtidos nos ensaios de fermentabilidade em que se usou mosto tratado segundo o binômio  $130^{\circ}\text{C}/37\text{s}$  para as duas linhagens de leveduras testadas. Nesses experimentos foram obtidas as menores produções específicas de células,  $Y_{\text{x/s}}$ , e de glicerol,  $Y_{\text{g/s}}$ , Figuras 7 e 8, e também foram obtidos o segundo menor valor de  $\mu_{\text{max}}$  e da razão  $\text{DO}_{\text{final}}/\text{DO}_{\text{inicial}}$ , com tempos de adaptação normais, Tabelas-4 e 5. Nos testes com mostos tratados a  $135^{\circ}\text{C}/5\text{s}$  embora as velocidades de reprodução obtidas para as duas linhagens fossem mínimas, os tempos de adaptação praticamente dobraram e nessa condição foi obtido o menor rendimento por subprodutos para a linhagem LNF BG-1, Figuras-7-8. O rendimento da fermentação medido de acordo com a equação de Gay-Lussac, (Eq.13) variou de 85.30% a 86.19% um pouco abaixo do rendimento por subprodutos, Tabela-8. O rendimento, de acordo com Gay-Lussac, assume que todo carbono proveniente da glicose se transforma em  $\text{CO}_2$  e etanol. Isso resulta num rendimento teórico igual a 0.511 g de etanol/g de glicose, valor maior do que os valores teóricos reais obtidos quando são considerados os outros produtos formados na fermentação como biomassa e glicerol. O balanço de carbono, considerando massa total de

produtos recuperados nos ensaios de fermentabilidade, foi de 92.74% a 95.64% em relação à massa de ART consumido o que significa que 4.36 a 7.26% da massa de açúcar desaparecido não foi recuperada nos produtos analisados, Tabela-8. O método do cálculo do rendimento por subprodutos considera o desdobramento da molécula de glicose nos produtos etanol, CO<sub>2</sub>, glicerol, levedura e açúcar residual como os mais significativos para medição e análise de produtos formados. Outros produtos são formados mas em quantidades não significativas como os alcoóis superiores que representam 0.2% do etanol produzido (Finguerut *et. al* 1985; Finguerut e Rossell 1985). Nesse caso, erros analíticos e CO<sub>2</sub> dissolvido no meio poderiam explicar boa parte das diferenças encontradas.

#### FIGURA-7

#### FIGURA-8

As fermentações alcoólicas industriais são conduzidas em média em 8.88h e com alta densidade celular, 10.66% (v/v), Tabela-1 do Anexo-2. O tempo de conversão total dos açúcares durante os testes de fermentabilidade desta pesquisa foi de 52h sendo que a concentração celular nos ensaios ficou entre 1.65-2.40% (v/v), Tabela-9. Quanto ao tempo de fermentação para conversão superior a 99% dos açúcares, bem como, os tempos de adaptação encontrados nos testes de crescimento celular para as duas linhagens, vale ressaltar que o inóculo inicial de todos os testes de fermentação foi de 0.01g de células enquanto que a concentração média de ART dos mostos foi 21.8% ou 237.40 g/L considerando a massa específica do mosto igual a 1.089g/l, Tabelas 1-8 do

Anexo-1. Segundo Maiorella *et al.* (1981), a inibição às leveduras se torna mais pronunciada em concentrações de açúcares acima de 150 g/L. As bases moleculares para a resposta de leveduras a choque osmótico são conhecidas (Hohmann 2002; Hohmann et al. 2007) e na presença de altas concentrações de açúcares fermentescíveis e outros solutos, acontecem respostas metabólicas como perda de água intracelular, produção de glicerol como agente osmoregulador, acúmulo de trealose, entre outros efeitos, que num processo de adaptação a esta nova condição, acaba inibindo o crescimento celular (Devantier et al. 2005). Concomitante ao choque osmótico acontece a produção de etanol que deve inibir o crescimento celular e ter impacto sobre a viabilidade celular. Portanto é de se esperar que uma inibição inicial sobre um inóculo muito pequeno se traduziu em um tempo maior de fermentação para o consumo total dos açúcares do meio bem como em fases de adaptação que para a linhagem LNF SA-1 foi de até 4.9693h e para a linhagem LNF BG-1 foi de até 6.6541h. Entretanto, os tempos de adaptação obtidos para as linhagens LNF SA-1 e LNF BG-1 iguais a 11.1712h e 10.8773h respectivamente, quando utilizado mosto submetido a tratamento térmico de 135°C/5s, não foram decorrentes de inibição osmótica e por produto formado apenas, mas também devido a algum produto inibidor formado no tratamento do mosto nessa temperatura mais elevada, sendo o ácido láctico o principal produto da degradação alcalina da sacarose, segundo Kelly e Brown (1978) ou ainda a questão da precipitação de metais em pHs alcalinos discutida acima.

Em condições de alta densidade celular, a multiplicação de células é um fator de menor relevância, sendo a fermentação o fenômeno dominante. Ao

contrário, em baixa densidade celular, é necessário o acúmulo de células, para depois ocorrer a fermentação para a produção de etanol. Nessa condição o fator nutricional pode ser determinante para a eficiência do processo.

A produtividade celular em etanol encontrada nesta pesquisa ficou entre 0.24-0.34 g etanol/g célula/h, Tabela-9, compatível com a produtividade celular média reportada no Controle Mútuo de 0.32g etanol/g célula/h, Tabela-2 do Anexo-2. É interessante destacar que, na média, as fermentações industriais são conduzidas com a presença de contaminantes com razão de infecção que indica a proporção entre contaminantes bacterianos e leveduras, igual a 30.99%, Tabela-2 do Anexo-2. Do ponto de vista de perda setorial, pode-se inferir que 51% das perdas totais determinadas estão concentradas no setor de fermentação, Tabela-3 do Anexo-2. Estes números são referentes à safra de 2005 e variam de acordo com a proporção entre açúcar e álcool produzidos, mas a perda setorial da fermentação é sempre significativa (Centro de Tecnologia Copersucar, 1996).

## TABELA - 9

### **Conclusão**

Em se tratando de tratamento térmico, em geral a recomendação é pelo uso das condições mais brandas de temperatura por razões econômicas de economia de energia, de preservação de nutrientes, fatores de qualidade e formação de compostos inibidores. Entretanto os testes de avaliação da fermentabilidade dos mostos tratados termicamente mostraram que a condição mais branda de temperatura, 125°C, não apresentou maior rendimento. O

rendimento máximo foi encontrado, para as duas linhagens testadas, usando mosto tratado com o binômio 130°C/37s, uma condição intermediária.

Os ensaios desta pesquisa se revelaram como aliados na otimização do tratamento térmico, baseado unicamente na destruição de micro-organismo alvo e na preservação de açúcares, porque o mosto é mais do que açúcares dissolvidos, trata-se de uma matriz complexa de macro e micro nutrientes essenciais para as leveduras que podem ser afetados pelo tratamento térmico. Portanto experimentos do tipo dos testes de fermentabilidade desta pesquisa, que medem respostas podem ser úteis na escolha do melhor tratamento térmico a ser implementado.

Os testes de fermentabilidade apresentaram rendimento compatível com os rendimentos industriais informados e se as mesmas condições de anaerobiose e alta densidade celular dos processos industriais fossem obtidas, o rendimento médio seria maior do que o rendimento industrial.

### **Sugestões**

Configurar os testes de fermentabilidade dos mostos tratados termicamente incluindo o reciclo de células para avaliar se a exposição contínua das leveduras ao mosto que resultou em maior rendimento preserva os melhores resultados após um número grande de ciclos e realizar os ensaios de cinética de crescimento das leveduras mediante contagem de células em vez de medir indiretamente a densidade ótica, particularmente importante para o parâmetro população final,  $N_{final}$ .

## Agradecimento

Os autores agradem o apoio das empresas LNF, Usina Santa Rosa e do Centro de Tecnologia Canavieira no fornecimento de materiais utilizados nesta pesquisa.

## Nomenclatura

$A(t) = \frac{\ln(e^{-\mu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu_t - h_0})}{\mu_{\max}}$	função relacionada com o estado fisiológico das células e condições de meio usada no modelo de Baranyi e Roberts (1994)
$[\text{ART}]_{\text{vinho}}$	concentração de ART residual no vinho fermentado (%m/m)
$[\text{etanol}]_{\text{vinho}}$	concentração de etanol no vinho fermentado (%m/m)
$[\text{glicerol}]_{\text{vinho}}$	concentração de glicerol no vinho fermentado (%m/m)
ART	açúcares redutores Total
C	concentração de células na fermentação (%v/v)
CCI	concentração de células em massa seca no inóculo (g/g)
CCV	concentração de células em massa seca na fermentação (g/g)
C-mol de biomassa	peso molecular por átomo de carbono da biomassa. Ex. de composição elementar para <i>Saccharomyces</i>

*cerevisiae*:  $\text{CH}_{1.83}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.17}$

C-mol de glicose	peso molecular por átomo de carbono da glicose $\text{CH}_{12}\text{O}_6$
Conv	conversão de açúcares na fermentação (%)
$d_{\text{etanol}}$	densidade do etanol (0.7893 kg/L)
$\text{DO}_{\text{final}}$	densidade ótica final em 600nm durante os ensaios cinéticos de crescimento celular (Absorbância %)
$\text{DO}_{\text{inicial}}$	densidade ótica final em 600nm durante os ensaios cinéticos de crescimento celular (Absorbância %)
f	densidade celular (0.33 kg/L)
$K_{\text{Ácido}}$	produção específica de ácidos em relação ao etanol produzido (kg/kg)
$K_{\text{ART}}$	ART residual, não fermentado, em relação ao etanol produzido (kg/kg)
$K_{\text{Glicerol}}$	produção específica de glicerol em relação ao etanol produzido (kg/kg)
$K_{\text{Levedura}}$	produção específica de levedura em relação ao etanol produzido (kg/kg)
$N(t)$	população no tempo t ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ou UFC/mL)
$N_0$	população inicial em t=0 ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ou UFC/mL)



$N_{final}$	população máxima atingida ( $DO_{600nm}$ ou UFC/mL)
$^{\circ}Brix$	Medido com refratômetro, expressa a relação entre índices de refração a 20°C e a concentração de sólidos solúveis totais (%m/m) de solução aquosa pura de sacarose. Como o açúcar é o principal componente de mostos, xaropes, caldos e méis, a concentração de sólidos solúveis totais é uma boa aproximação da concentração de sacarose, sendo amplamente usada na indústria sucroalcooleira
P1, P2, P3, P4	pesos dos Erlenmeyers durante a preparação para os testes de fermentabilidade (g)
Prod	produtividade específica de levedura em etanol (g/g/h)
$Prod_{ind}$	produtividade da fermentação (volume de reator (L)/volume de etanol produzido(L)/dia)
$R_{G-L}$	rendimento fermentativo a partir da Equação de Gay-Lussac (coeficientes mássicos): $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 0.511 C_2H_5OH + 0.489 CO_2$
Rsp	rendimento fermentativo por subprodutos
$Y_{g/s}$	rendimento específico de glicerol em relação ao substrato consumido (g/g)
$Y_{p/s}$	rendimento específico de produto em relação ao substrato consumido (g/g)

$Y_{x/s}$	rendimento específico de células em relação ao substrato consumido (g/g)
$\mu_{max}$	velocidade específica máxima de crescimento

## Referências

- ABNT. 1980. Determinação da Massa Específica e do teor Alcoólico do Álcool Etílico e suas Misturas com água (NBR-5992, MB-1533).
- ALVARENGA, V.O. 2008. Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana-de-açúcar. Msc Thesis. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, Brasil.
- AMORIM, H.V. (org). 2005. Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia. (Fermentec, editor) pp. 448, Piracicaba-SP.
- ANDRIETTA, S. R. 1994. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala industrial. PhD Thesis, 178p, Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo-Brasil.
- ANDRIETTA, S.R. 1997. Conceitos de processos de fermentação alcoólica contínua. In Atualização Tecnológica na Indústria Sucroalcooleira: Apostila do curso. Piracicaba, 1997. CPQBA-UNICAMP/Stab, 12p.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. 1995. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. Stab 13(4), 22-25.

- ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C. and ANDRIETTA, M.G.S. 1999. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. *Stab* 7(5), 54-59.
- ATALA, D.I.P. 2000. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética, convalidação e parâmetros e otimização do processo. Msc Thesis, 135p, Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo-Brasil.
- BARANYI, J. and ROBERTS, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- BASILIO, A.C.M.; de ARAÚJO, P.R.L.; de MORAIS, J.O.F.; DA SILVA FILHO, E.A.; DE MORAIS JR, M.A. and SIMÕES, D.A. 2008. Detection and identification of wild yeast contaminants of industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology* 56, 322 – 326.
- BASSO, L.C. 2006. Fisiologia e ecologia microbiana. In: Workshop 1º Workshop tecnológico de produção de etanol- Projeto PPPP – Diretrizes de políticas públicas para a agroindústria canavieira do estado de São Paulo, Sessão 2, 2006, Lorena, São Paulo. Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper\\_sessao\\_2\\_Basso.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessao_2_Basso.pdf)>. Acesso em 30/mai/2010.
- BAYROCK, D.P.; THOMAS, K.C. and INGLEDEW, W.M. 2003. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. *Appl Microbiol Biotechnol* 62,498–502.

BISHOFF, K.M.; SKINNER-NEMEC, K.A and LEATHERS, T.D. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34, 739-744.

CABRINI, K.T.; GALLO, C.R. 1999. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em Usina do Estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agrícola* 56(1),1-10.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. 2006 – Controle mútuo agroindustrial safra 2005/06.

CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. 1996. Perdas na fermentação: é possível reduzir! *Industrial Informa* 50, 1-2.

CÉSAR, A.R.P. and FINGUERUT, J. 1992. Relatório Técnico Referente à Produção de Subprodutos na Fermentação Alcoólica. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar RT-581-92/93,1-12.

DEVANTIER, R.; SCHEITHAUER, B.; VILLAS-BÔAS, S.G.; PEDERSEN, S. and OLSSON, L. 2005. Metabolite profiling for analysis of yeast stress response during very high gravity ethanol fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 703-714.

EUROPA. Council and Parliament prohibit antibiotics as growth promoters: Commissioner Byrne welcomes adoption of Regulation on feed additives. 2003. EUROPA PRESS REALESSES RAPID, Brussels, 22 July 2003. Disponível em <<http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/03/1058&format=HTML&aged=0&language=EN&guiLanguage=en>> acesso em 25/abril/2010.

695 FINGUERUT, J. and ROSSELL, C.E.V. 1985. Relatório Técnico Referente à  
696 Produção de Subprodutos na Fermentação Alcoólica. Piracicaba: Centro de  
697 Tecnologia Copersucar RT-188-85/86,1-5.

698 FINGUERUT, J.; LEIMER, K.H.; LUCREDI, H. A. and ROSSELL, C.E.V. 1984.  
699 Considerações sobre o cálculo do rendimento da fermentação alcoólica  
700 contínua e descontínua. Boletim Técnico Copersucar 28/84(10), 20-26.

701 FINGUERUT, J.; LEIMER, K.H.; LUCREDI, H. A.; ROSSELL, C.E.V. 1985.  
702 Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. Boletim  
703 Técnico Copersucar 35/85(12), 45-48.

704 GALLO, C.R. and CANHOS, V.P. 1991. Contaminantes bacterianos na  
705 fermentação alcoólica-revisão. Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos 9(4/5),  
706 35-40.

707 GONZALES, C.A. e ROSSELL, C.E.V. 1986. Processos de fabricação de açúcar e  
708 álcool. Centro de Tecnologia Copersucar RT-207-85/86, 1-10.

709 HEIJNEN, J.J. and van DIJKEN, J.P. 1992. In Search of a Thermodynamic  
710 Description of Biomass Yields for the Chemotrophic Growth of  
711 Microorganisms. Biotechnology and Bioengineering 39, 833-858.

712 HOHMANN, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts.  
713 Microbiology and Molecular Biology Reviews 66, 300-372.

714 HOHMANN, S.; KRANTZ, M. and NORDLANDER, B. 2007. Yeast osmoregulation.  
715 Methods in Enzymology 428, 29-45.

716 KELLY, F.H.C e BROWN, D.W. 1978. Thermal Decomposition and colour  
717 formation in aqueous sucrose solutions. Sugar Technology Reviews 6(1), 1-  
718 48.

719 KLAUSHOFER, H.; CLARKE, M.A.; REIN, P.W. and MAUCH, W. 1998.  
720 Microbiology. In Sugar Technology-Beet and Cane Sugar Manufacture (Van  
721 der Poel, P.W., Schiweck, H. and Schwartz T., eds) pp 993 – 1008, Verlag  
722 Dr. Albert Bartens KG, Berlin, Germany.

723 LANE, H. and EYNON, L. 1923. Determination of reducing sugar by means of  
724 Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. Journal of the  
725 Society of Chemistry Industry, London 42, 32T-37T.

726 LEDERGERBER, U.; REGULA, G.; STEPHAN, R.; DANUSER, J.; BISSIG, B. and  
727 STÄRK, K.D.C. 2003. Risk factors for antibiotic resistance in campylobacter  
728 spp. isolated from raw poultry meat in Switzerland. BMC Public Health  
729 3(39). Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/39/abstract>>. Acesso  
730 em 15 set. 2004.

731 LIMA, T.C.S.; GRISI, B.M. and BONATO, M.C.M. 1999. Bacterial isolated from a  
732 sugarcane agroecosystem: their potential produtction of  
733 polyhydroxyalcanoates and resistance to antibiotics. Revista de  
734 Microbiologia 30, 214-224.

735 LNF. LNF Latino Americana. 2010. Disponível em <http://www.lnf.com.br/index.html>.  
736 Acesso em 04/jun/2010.

737 MAIORELLA, B.; WILKE, Ch.R. and BLANCH, H.W. 1981. Bioenergy. Advances in  
738 Biochemical Engineering 20, 44-92.

739 MARILLER, C. 1951. Distillerie et agricole et industriellelevurerie, sous-produits.  
740 Paris: Baillière 632p.

741 NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the  
742 determination of glucose. Journal Biological Chemical 153, 375-380.

743 NOBRE, T. de P.; HORII, J. and ALCARDE, A.R. 2007. Viabilidade celular de  
 744 *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias  
 745 contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de*  
 746 *Alimentos* 27(1), 20-25.

747 NOLASCO JUNIOR, J. 2005. Desenvolvimento de processo térmico otimizado  
 748 para mosto de caldo de cana na fermentação alcoólica, pp. 38-176, Msc  
 749 Thesis, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Faculdade de  
 750 Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo-Brasil.

751 NOLASCO JUNIOR, J. e DE MASSAGUER, P.R. 2010. Verificação Experimental  
 752 De Processo Térmico Para Mostos A Base De Caldo De Cana E Melaço  
 753 Para Produção De Bioetanol Em Unidade Piloto De Esterilização Contínua.  
 754 In *Eficiência De Processo Térmico Para Mostos A Base De Caldo De Cana*  
 755 *E Melaço Na Produção De Bioetanol*, Capítulo 3, (NOLASCO JUNIOR, J.  
 756 autor), PhD Thesis, Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de  
 757 Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo- Brasil.

758 SCHELL, D.J.; DOWE, N.; IBSEN, K.N.; RILEY, C.J.; RUTH, M.F.A. and  
 759 LUMPKIN, R.E. 2007. Contaminant occurrence, identification and control in  
 760 a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresource*  
 761 *Technology* 98, 2941-2948.

762 SIGMA. 1995. Triglyceride (GPO-TRINDER), Quantitative, Enzymatic  
 763 Determination of Glycerol, True Triglycerides, and Total Triglycerides in  
 764 Serum or Plasma at 540 nm. Procedure nº 337.

765 SKINNER, K.A. and LEATHERS, T.D. 2004. Bacterial contaminants of fuel ethanol  
 766 production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31, 401-  
 767 408.

768 SOMOGYI, M.A. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of*  
 769 *Biological Chemical* 160, 61-68.

770 STROPPIA, C.T. 2002. Dinâmica populacional de leveduras caracterizadas por  
 771 eletro-cariótipo e desempenho fermentativo em processos de fermentação  
 772 alcoólica. PhD Thesis, pp 1-130, Universidade Estadual de Campinas –  
 773 UNICAMP – Faculdade de Engenharia Química, Campinas, São Paulo,  
 774 Brasil.

775 STROPPIA, C.T.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.  
 776 and SERRA, G. E. 2000. Use of penicillin and monesin to control bacterial  
 777 contamination of brazilian alcohol fermentations. *International Sugar Journal*  
 778 102(1214), 78-82.

779 TOSETTO, G.M. 2002. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de  
 780 levedura na produção de Etanol. Msc Thesis, 82p, Universidade Estadual  
 781 de Campinas – Faculdade de Engenharia Química, Campinas, São Paulo-  
 782 Brasil.

783 TROMBINI, M.A.M.; ROVANHOL, A.A.; VITTI, L.S.S.; BEDA, D.F.; PORTO,  
 784 R.C.B. and SÁ, J.S. 1988. Causas da contaminação e suas conseqüências  
 785 em usinas de açúcar e álcool. *Stab* 16(6), 1-18.

786 VAN DEN BOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N.; TOP, J. and  
 787 STOBBERINGH, E.E. 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in  
 788 poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 497-505.



Disponível em: <  
<http://jac.oupjournals.org/cgi/content/abstract/49/3/497>>. Acesso em  
10/12/2004.

WANNMACHER, L. 2004. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência  
microbiana: Uma guerra perdida? ISSN 1810-0791 1(4), 1-6.

YOKOYA, F. and OLIVA-NETO, P. 1991. Características da floculação de  
leveduras por *Lactobacillus Fermentum*. Revista de Microbiologia 22(1),  
12-16.

**TABELA-1. IDENTIFICAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS E AS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO DOS MOSTOS CORRESPONDENTES, CONFORME DESCRITO EM NOLASCO JUNIOR E DE MASSAGUER (2010).**

Identificação do experimento	Identificação do processo térmico do mosto	T ( °C )	TR médio (retenção), (s)*
125/A-1	125/A	125	30.49
125/A-2	125/A	125	30.49
125/B-1	125/B	125	30.36
125/B-2	125/B	125	30.36
130/A-1	130/A	130	10.92
130/A-2	130/A	130	10.92
130/B-1	130/B	130	10.92
130/B-2	130/B	130	10.92
130/C-1	130/C	130	37.14
130/C-2	130/C	130	37.14
130/C-1	130/D	130	37.10
130/C-2	130/D	130	37.10
135/A-1	135/A	135	4.72
135/A-2	135/A	135	4.72
135/B-1	135/B	135	4.73
135/B-2	135/B	135	4.73

\* TR= tempo de residência.

**TABELA-2. AJUSTE DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MODELADAS PARA A LINHAGEM LNF BG-1, CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994), UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4) PARA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{\max}$ ), TEMPO DE ADAPTAÇÃO ( $\lambda$ ), POPULAÇÃO INICIAL ( $N_0$ ) E POPULAÇÃO FINAL ( $N_{\text{final}}$ ).**

Experimento/Parâmetro	número de pontos	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$N_0$	$N_{\text{final}} = \text{Log}_{10}(\text{DO}_{\text{final}}/\text{DO}_{\text{inicial}})$	erro do ajuste	R <sup>2</sup>
125/A-1	17	0.5804	6.3119	0.2082	2.4848	0.0648	0.9904
125/A-2	17	0.5622	6.9084	0.1844	2.4816	0.1125	0.9688
125/B-1	18	0.6633	6.4179	0.2278	2.5117	0.0985	0.9782
125/B-2	18	0.4578	6.9782	0.4558	2.5570	0.0674	0.9898
130/A-1	13	0.3552	6.0515	0.8010	2.2550	0.1093	0.9574
130/A-2	13	0.3080	6.0755	0.8257	2.2820	0.1035	0.9608
130/B-1	14	0.3629	5.6837	0.6468	2.3277	0.1000	0.9720
130/B-2	14	0.4067	6.0215	1.0482	2.9727	0.0928	0.9823
130/C-1	15	0.1277	5.1483	0.4223	1.7902	0.0609	0.9876
130/C-2	15	0.1433	6.4551	0.4602	1.8345	0.0262	0.9980
130/D-1	17	0.2395	6.7997	0.4688	1.7815	0.0471	0.9921
130/D-2	17	0.1702	5.2601	0.5208	1.9393	0.0652	0.9859
135/A-1	11	0.0981	10.2170	0.8907	1.7097	0.0523	0.9735
135/A-2	11	0.0863	11.3098	1.4375	2.1974	0.0554	0.9691
135/B-1	11	0.1043	10.6724	0.9986	1.8166	0.0531	0.9745
135/B-2	11	0.0863	11.3098	1.3240	2.0839	0.0554	0.9691

**TABELA-3. AJUSTE DAS CURVAS DE CRESCIMENTO MODELADAS PARA A LINHAGEM LNF SA-1, CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994), UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4) PARA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{\max}$ ), TEMPO DE ADAPTAÇÃO ( $\lambda$ ), POPULAÇÃO INICIAL ( $N_0$ ) E POPULAÇÃO FINAL ( $N_{\text{final}}$ ).**

Experimento/Parâmetro	número de pontos	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$N_0$	$N_{\text{final}} = \text{Log}_{10}(\text{DO}_{\text{final}}/\text{DO}_{\text{inicial}})$	erro do ajuste	R <sup>2</sup>
125/A-1	18	0.4253	4.4623	0.4195	2.5429	0.0743	0.9881
125/A-2	18	0.4138	5.6766	1.2279	3.3659	0.0544	0.9939
125/B-1	18	0.4071	4.0457	0.4123	2.5173	0.0753	0.9878
125/B-2	19	0.4288	5.6926	1.2060	3.3402	0.0588	0.9934
130/A-1	13	0.4242	3.2295	0.2985	2.7513	0.1155	0.9766
130/A-2	13	0.4998	2.8943	0.1724	2.7162	0.1023	0.9799
130/B-1	16	0.4067	2.3088	0.1778	2.7901	0.0584	0.9937
130/B-2	17	0.4344	3.9655	0.6912	3.2214	0.1276	0.9790
130/C-1	15	0.2250	4.0757	0.4311	1.8531	0.0588	0.9874
130/C-2	15	0.2664	4.6714	0.3667	1.7209	0.0347	0.9955
130/D-1	16	0.3383	5.3162	0.3929	1.7492	0.0467	0.9919
130/D-2	17	0.2796	5.2545	0.3658	1.6882	0.0361	0.9947
135/A-1	11	0.1446	11.5121	0.3663	1.1596	0.0360	0.9888
135/A-2	11	0.2466	10.7199	0.4892	1.3877	0.0194	0.9969
135/B-1	11	0.2101	11.7762	0.3721	1.1627	0.0502	0.9790
135/B-2	11	0.1519	10.6766	0.4894	1.3857	0.0136	0.9985

**TABELA-4. T-TESTE PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS A  $P < 0.05$  DOS RESULTADOS MÉDIOS\*\*\* DE VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{MAX}$ ), POPULAÇÃO FINAL ( $N_{final}$ ) E TEMPOS DE ADAPTAÇÃO ( $\lambda$ ) e OBTIDOS PARA A LINHAGEM DE LEVEDURA LNF BG-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (BRIX 21.5% E PH= 6.4), UTILIZANDO O PROGRAMA STATISTICA®.**

Identificação do experimento**	$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )*	$N_{final} = \text{Log}_{10}(\text{DO}_{final}/\text{DO}_{inicial})_{600nm}$ *	$\lambda$ (h)*
125/A/B	0.5659 <sup>a</sup> (0.0844)	2.5088 <sup>a</sup> (0.0349)	6.6541 <sup>a</sup> (0.3378)
130/A/B	0.3582 <sup>b</sup> (0.0404)	2.4594 <sup>a,c</sup> (0.3436)	5.9580 <sup>b</sup> (0.1842)
130/C/D	0.1701 <sup>c</sup> (0.0494)	1.8364 <sup>b</sup> (0.0724)	5.9158 <sup>a, b</sup> (0.8349)
135/A/B	0.0938 <sup>d</sup> (0.0089)	1.9519 <sup>c,b</sup> (0.2270)	10.8773 <sup>c</sup> (0.5329)

\*Letras diferentes indicam diferença significativa a  $p < 0.05$ .

\*\* A identificação dos experimentos reflete a média de cada binômio de tempo e temperatura dos tratamentos térmicos dos mostos utilizados com suas repetições.

\*\*\* Média de 4 valores. Desvio padrão entre parêntesis.

**TABELA-5. T-TESTE PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS A  $P < 0.05$  DOS RESULTADOS MÉDIOS\*\*\* DE VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{MAX}$ ), POPULAÇÃO FINAL ( $N_{final}$ ) E DE TEMPOS DE ADAPTAÇÃO ( $\lambda$ ) OBTIDOS PARA A LINHAGEM DE LEVEDURA LNF SA-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (BRIX 21.5% E PH= 6.4), UTILIZANDO O PROGRAMA STATISTICA®.**

Identificação do experimento **	$\mu_{max} (h^{-1})^*$	$N_{final} = \text{Log}_{10}(\text{DO}_{final}/\text{DO}_{inicial})_{600nm}^*$	$\lambda (h)^*$
125/A/B	0.4187 <sup>a</sup> (0.0100)	2.9416 <sup>a</sup> (0.4754)	4.9693 <sup>a</sup> (0.8433)
130/A/B	0.4413 <sup>a</sup> (0.0407)	2.8697 <sup>a</sup> (0.2364)	3.0995 <sup>b</sup> (0.6914)
130/C/D	0.2773 <sup>b</sup> (0.0469)	1.7528 <sup>b</sup> (0.0713)	4.8295 <sup>a</sup> (0.5804)
135/A/B	0.1883 <sup>c</sup> (0.0487)	1.2739 <sup>c</sup> (0.1302)	11.1712 <sup>c</sup> (0.5570)

\* Letras diferentes indicam diferença significativa a  $p < 0.05$ .

\*\* A identificação dos experimentos reflete a média de cada binômio de tempo e temperatura dos tratamentos térmicos dos mostos utilizados com suas repetições.

\*\*\* Média de 4 valores. Desvio padrão entre parêntesis.

**TABELA-6. T-TESTE PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS A  $P < 0.05$  DOS RESULTADOS DE VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ( $\mu_{\text{MAX}}$ ) ENTRE AS DUAS LINHAGENS DE LEVEDURAS LNF SA-1 E LNF BG-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (BRIX 21.5% E pH= 6.4), UTILIZANDO O PROGRAMA STATISTICA®.**

EXPERIMENTOS	$\mu_{\text{max}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$		p
	LNF SA-1	LNF BG-1	
125/A/B	0.4187 <sup>a*</sup>	0.5659 <sup>a</sup>	0.0505
130/A/B	0.4413 <sup>b</sup>	0.3582 <sup>b</sup>	0.1120
130/C/D	0.2773 <sup>c</sup>	0.1701 <sup>d</sup>	0.0004
135/A/B	0.1883 <sup>c</sup>	0.0938 <sup>f</sup>	0.0330

\* Letras diferentes indicam diferença significativa a  $p < 0.05$ .

\*\* A identificação dos experimentos reflete a média de cada binômio de tempo e temperatura dos tratamentos térmicos dos mostos utilizados com suas repetições.

**TABELA -7. T-TESTE PARA AVALIAÇÃO DE DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS A  $P < 0.05$  DOS RESULTADOS DE TEMPOS DE ADAPTAÇÃO ( $\lambda$ ) ENTRE AS DUAS LINHAGENS DE LEVEDURAS LNF SA-1 E LNF BG-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (BRIX 21.5% E pH= 6.4), UTILIZANDO O PROGRAMA STATISTICA®.**

EXPERIMENTOS	$\lambda(h)$		p
	LNF SA-1	LNF BG-1	
125/A/B	4.9693 <sup>a*</sup>	6.6541 <sup>b</sup>	0.0082
130/A/B	3.0995 <sup>c</sup>	5.9580 <sup>d</sup>	0.0022
130/C/D	4.8295 <sup>e</sup>	5.9158 <sup>e</sup>	0.0681
135/A/B	11.1712 <sup>f</sup>	10.8773 <sup>f</sup>	0.6142

\* Letras diferentes indicam diferença significativa a  $p < 0.05$ .

\*\* A identificação dos experimentos reflete a média de cada binômio de tempo e temperatura dos tratamentos térmicos dos mostos utilizados com suas repetições.

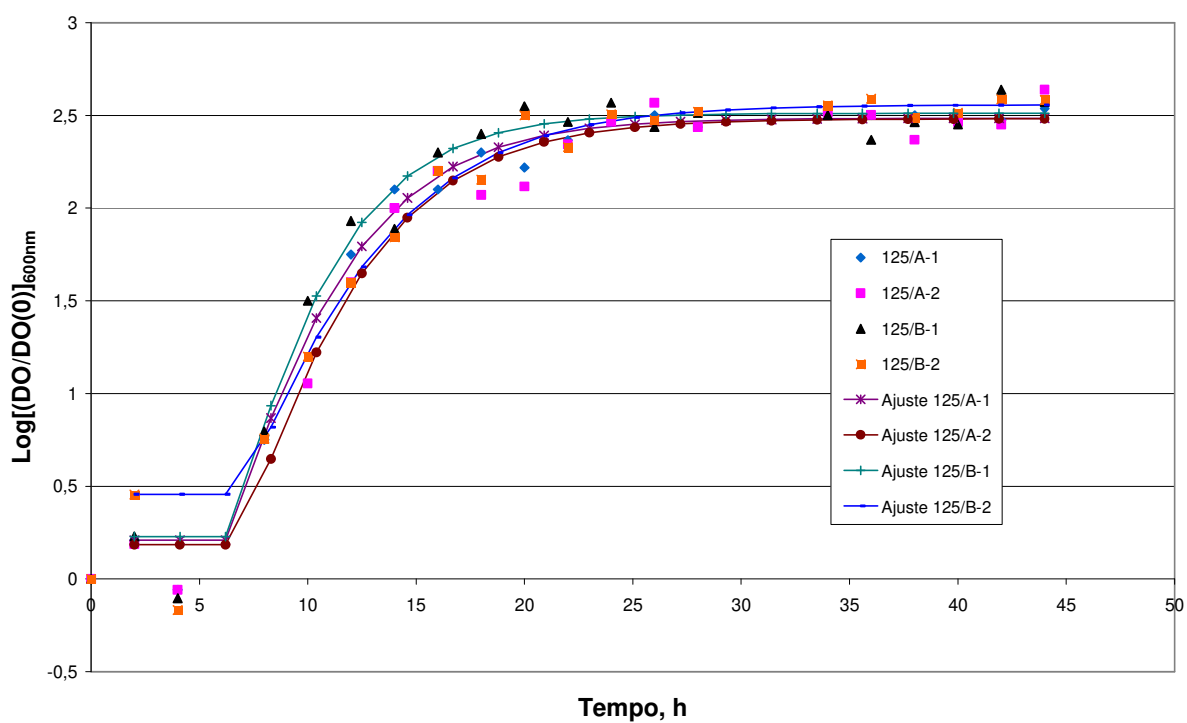


**TABELA 8. VALORES MÉDIOS DE RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO POR SUBPRODUTOS E DAS CONSTANTES UTILIZADAS NO SEU CÁLCULO ( EQ.7), RENDIMENTO DE GAY-LUSSAC E BALANÇO DE CARBONO OBTIDOS NOS TESTES DE FERMENTABILIDADE COM AS LINHAGENS DE LEVEDURA DE USO INDUSTRIAL NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL LNF SA-1 E LNF BG-1, UTILIZANDO OS MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE. (VALORES REPORTADOS REPRESENTAM MÉDIA ARITMÉTICA DE 6 ENSAIOS. ENTRE PARÊNTESES DESVIO PADRÃO DOS VALORES MÉDIOS).**

Processo Térmico	Linhagem de levedura	K <sub>Levedura</sub> g/g	K <sub>Glicerol</sub> g/g	K <sub>ART</sub> g/g	K <sub>ácido</sub> g/g	Rsp %	R <sub>G-L</sub> %	Balanço de C %
125/A/B/	LNF SA-1	0.08 (0.007)	0.06 (0.001)	0.01 (0.002)	0.00 (0.000)	87.56 (0.599)	85.49 (0.238)	95.64 (0.010)
	LNF BG-1	0.07 (0.009)	0.06 (0.004)	0.01 (0.000)	0.00 (0.000)	88.57 (0.950)	85.30 (0.409)	94.83 (0.006)
130/A/B	LNF SA-1	0.06 (0.003)	0.06 (0.002)	0.02 (0.004)	0.00 (0.000)	88.85 (0.383)	85.84 (0.668)	93.95 (0.006)
	LNF BG-1	0.07 (0.004)	0.06 (0.001)	0.02 (0.004)	0.00 (0.000)	88.71 (0.456)	85.95 (0.561)	94.17 (0.005)
130/C/D	LNF SA-1	0.06 (0.009)	0.05 (0.002)	0.02 (0.002)	0.00 (0.000)	89.33 (0.776)	86.04 (0.573)	92.74 (0.006)
	LNF BG-1	0.06 (0.011)	0.05 (0.003)	0.02 (0.003)	0.00 (0.000)	89.73 (0.887)	86.06 (0.477)	92.60 (0.007)
135/A/B	LNF SA-1	0.07 (0.009)	0.05 (0.005)	0.01 (0.001)	0.00 (0.000)	88.75 (1.023)	86.19 (0.493)	94.18 (0.005)
	LNF BG-1	0.08 (0.007)	0.06 (0.005)	0.02 (0.002)	0.00 (0.000)	87.60 (0.809)	85.91 (2.555)	95.14 (0.022)

**TABELA-9. PARÂMETROS MÉDIOS DE PROCESSO OBTIDOS NOS TESTES DE FERMENTABILIDADE COM AS LINHAGENS DE LEVEDURA DE USO INDUSTRIAL NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL LNFSA-1 E LNF BG-1, UTILIZANDO OS MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE. (VALORES REPORTADOS REPRESENTAM MÉDIA ARITMÉTICA DE 6 ENSAIOS. ENTRE PARÊNTESES DESVIO PADRÃO DOS VALORES MÉDIOS).**

Processo Térmico	Linhagem de levedura	Teor alcoólico		Teor de fermento final		Produtividade g/gh	Tempo de fermentação h
		%(m/m)	%(v/v)	%(m/m)	%(v/v)		
125/A/B	LNF SA-1	9.77 (0.058)	12.06 (0.069)	0.79 (0.069)	2.39 (0.208)	0.24 (0.020)	52
	LNF BG-1	9.70 (0.050)	11.97 (0.061)	0.69 (0.084)	2.10 (0.256)	0.28 (0.036)	52
	LNF SA-1	8.43 (0.094)	10.44 (0.114)	0.55 (0.027)	1.68 (0.082)	0.30 (0.015)	52
130/A/B	LNF BG-1	8.43 (0.230)	0.62 (0.086)	0.62 (0.086)	1.89 (0.261)	0.27 (0.035)	52
	LNF SA-1	9.08 (0.153)	11.24 (0.185)	0.59 (0.089)	1.78 (0.270)	0.31 (0.044)	52
130/C/D	LNF BG-1	9.08 (0.156)	11.23 (0.189)	0.55 (0.105)	1.65 (0.319)	0.34 (0.064)	52
	LNF SA-1	9.95 (0.106)	12.28 (0.127)	0.70 (0.081)	2.11 (0.246)	0.28 (0.033)	52
135/A/B	LNF BG-1	9.93 (0.290)	12.25 (0.349)	0.79 (0.046)	2.40 (0.139)	0.24 (0.020)	52



1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

1087        **FIGURA-1. CURVAS DE CRESCIMENTO DOS EXPERIMENTOS 125/A-1,**  
1088        **125/A-2, 125/B-1, 125/B-2, MODELADAS CONFORME BARANYI e ROBERTS**  
1089        **(1994) UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 PARA A LINHAGEM LNF BG-1**  
1090        **EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4). DADOS DO**  
1091        **AJUSTE NA TABELA-2.**

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

1106

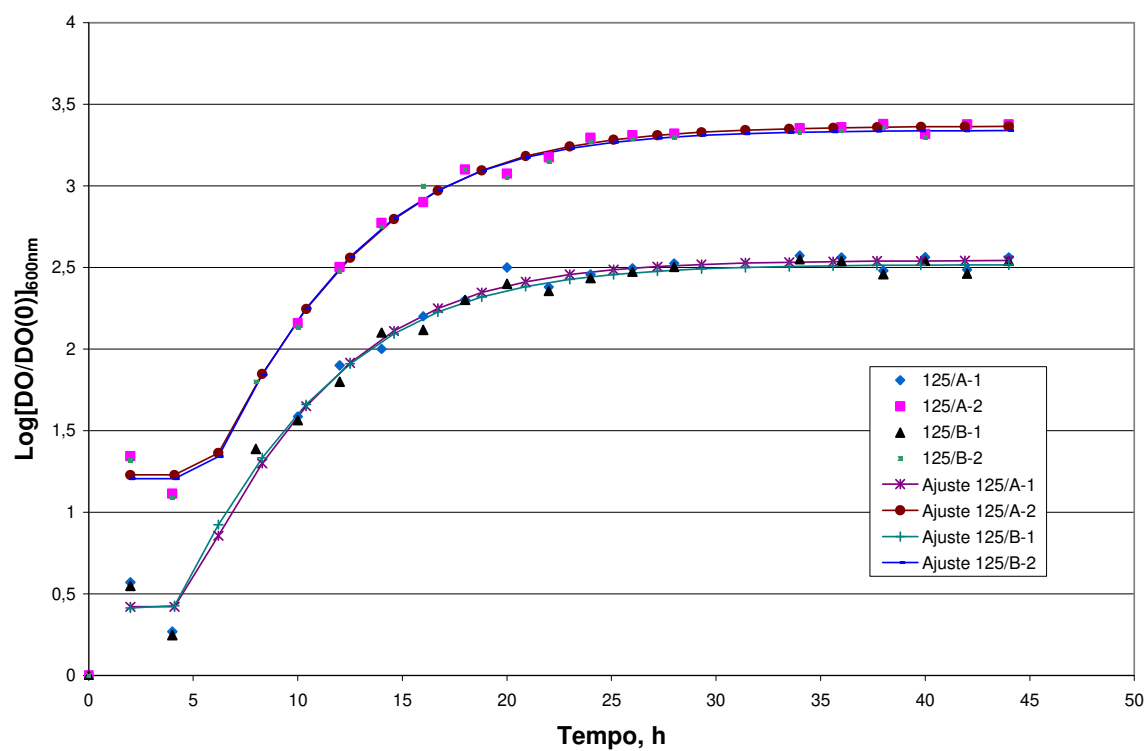


FIGURA-2. CURVAS DE CRESCIMENTO DOS EXPERIMENTOS 125/A-1, 125/A-2, 125/B-1, 125/B-2 MODELADAS CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994) UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 PARA A LINHAGEM LNF SA-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4). DADOS DO AJUSTE NA TABELA-3.

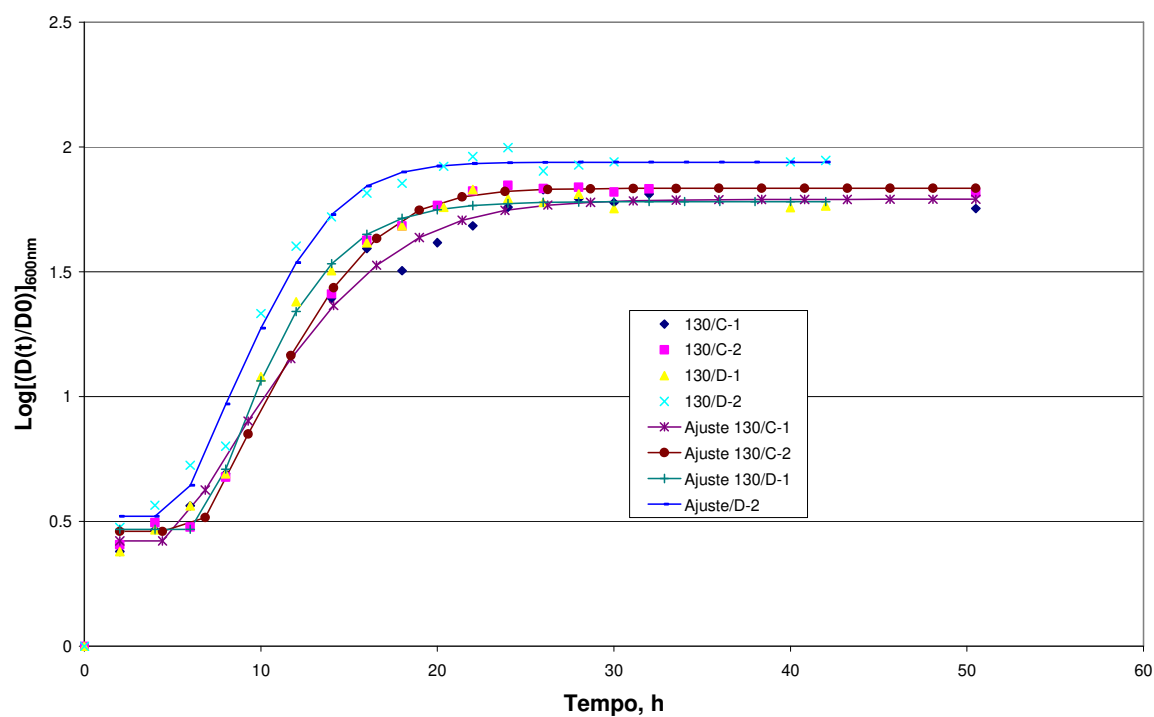


FIGURA-3. CURVAS DE CRESCIMENTO DOS EXPERIMENTOS 130/C-1, 130/C-2, 130/D-1, 130/D-2 MODELADAS CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994) UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 PARA A LINHAGEM LNF BG-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4). DADOS DO AJUSTE NA TABELA-3.



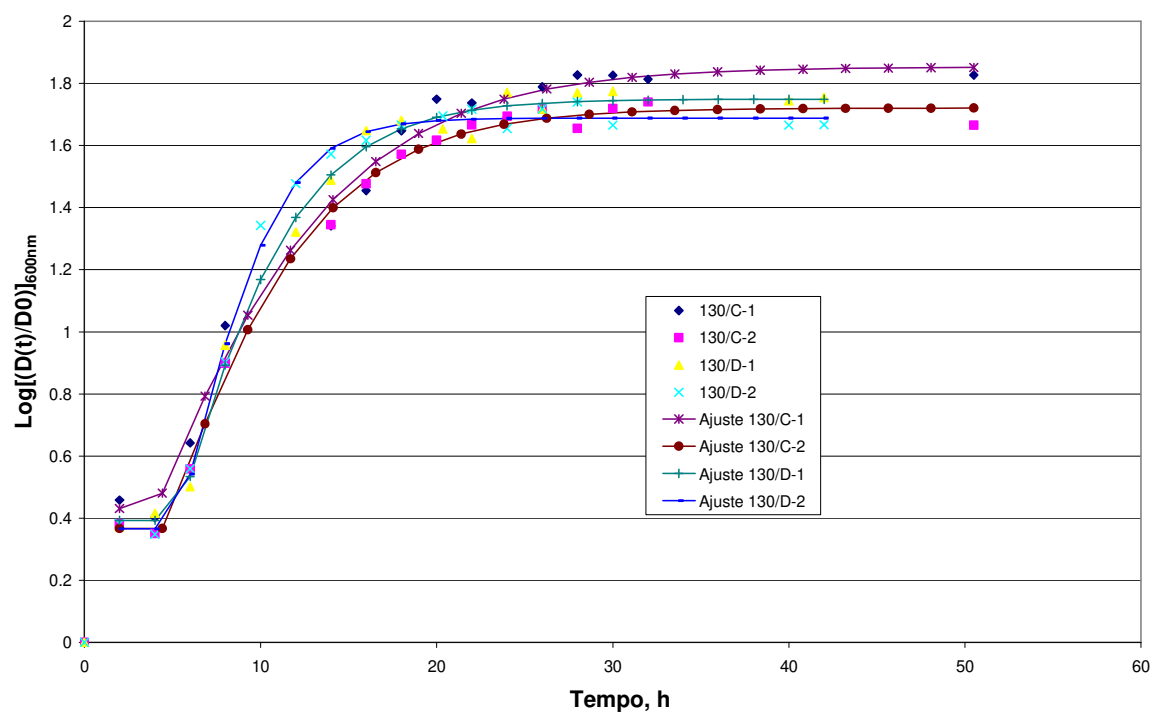


FIGURA-4. CURVAS DE CRESCIMENTO DOS EXPERIMENTOS 130/C-1, 130/C-2, 130/D-1, 130/D-2 MODELADAS CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994) UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 PARA A LINHAGEM LNF SA-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4). DADOS DO AJUSTE NA TABELA-3.

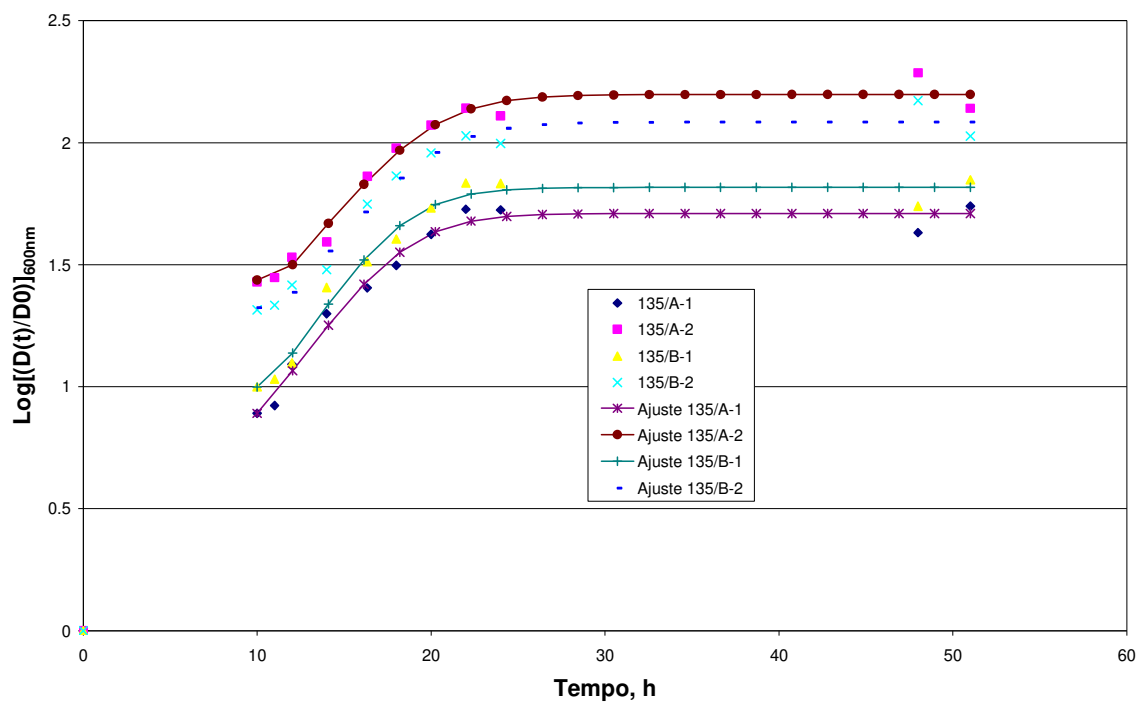


FIGURA-5. CURVAS DE CRESCIMENTO DOS EXPERIMENTOS 135/A-1, 135/A-2, 135/B-1, 135/B-2 MODELADAS CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994) UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 PARA A LINHAGEM LNF BG-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4). DADOS DO AJUSTE NA TABELA-3.

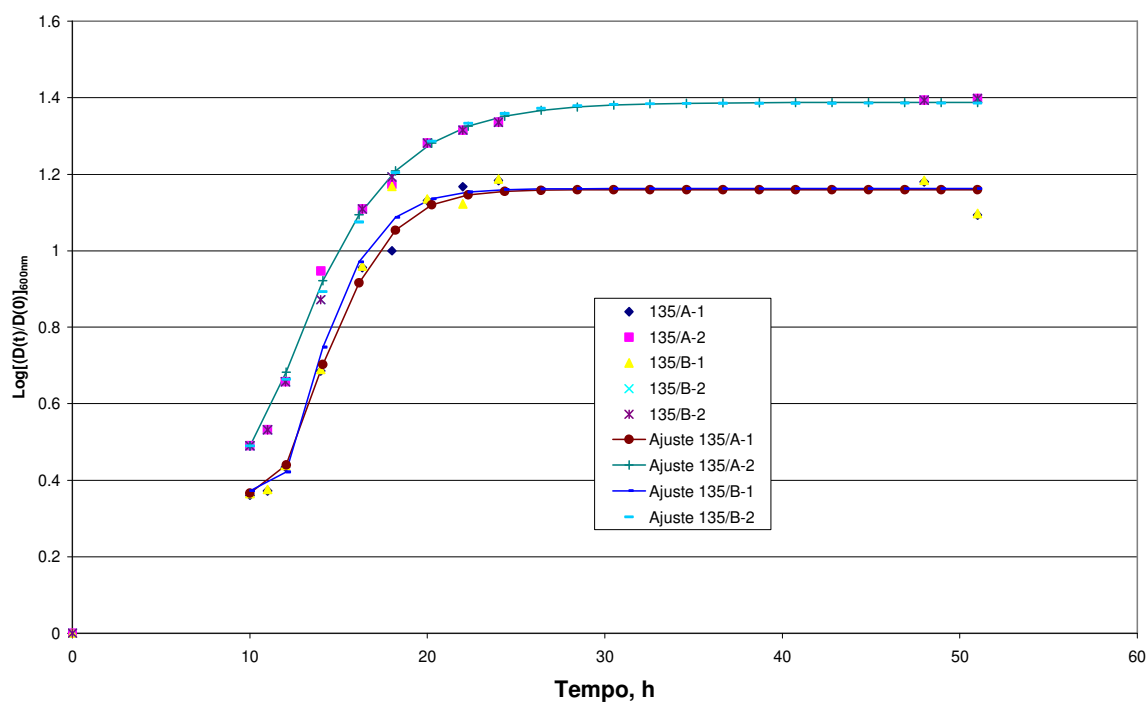


FIGURA-5. CURVAS DE CRESCIMENTO DOS EXPERIMENTOS 135/A-1, 135/A-2, 135/B-1, 135/B-2 MODELADAS CONFORME BARANYI e ROBERTS (1994) UTILIZANDO O SOFTWARE DMFIT 2.1 PARA A LINHAGEM LNF SA-1 EM MOSTOS TRATADOS TERMICAMENTE (21.5BRIX, pH=6.4). DADOS DO AJUSTE NA TABELA-3.

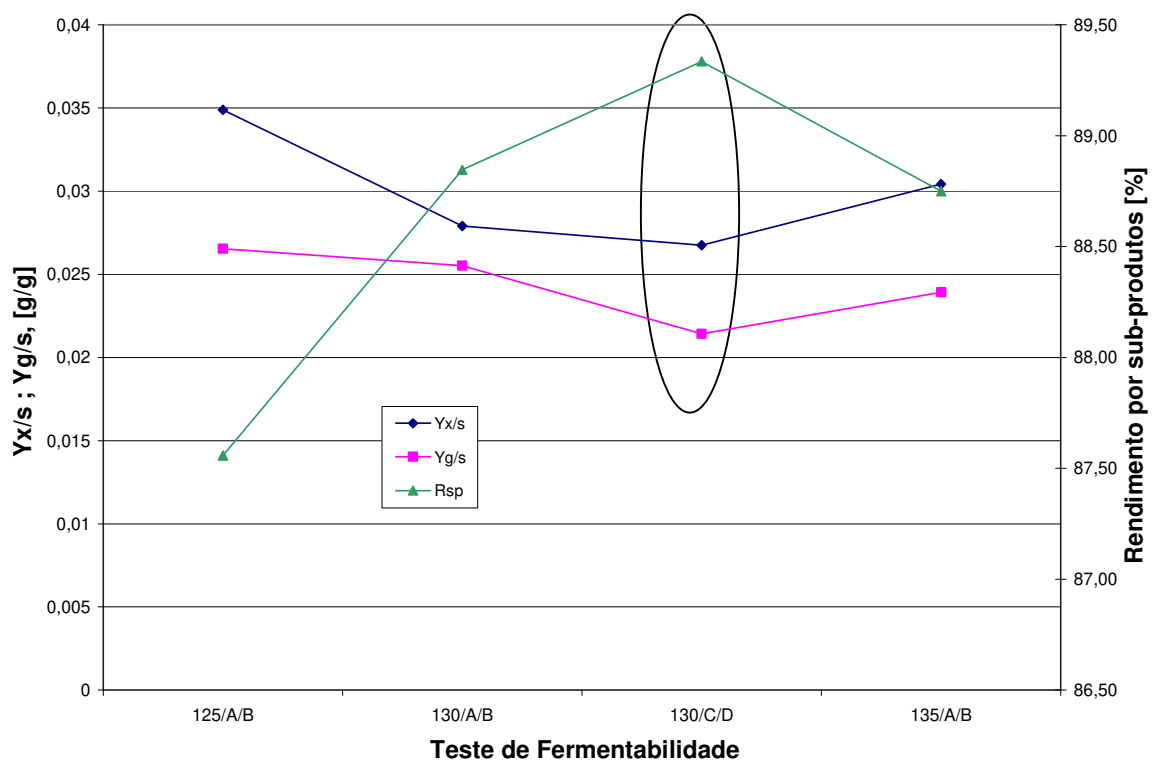


FIGURA-7. GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DAS PRODUÇÕES ESPECÍFICAS DE BIOMASSA E GLICEROL DO RENDIMENTO POR SB-PRODUTOS, PARA A LINHAEM LNF SA-1. (VALORES PLOTADOS REPRESENTAM MÉDI ARITIMÉTICA DE 6 RESULTADOS).



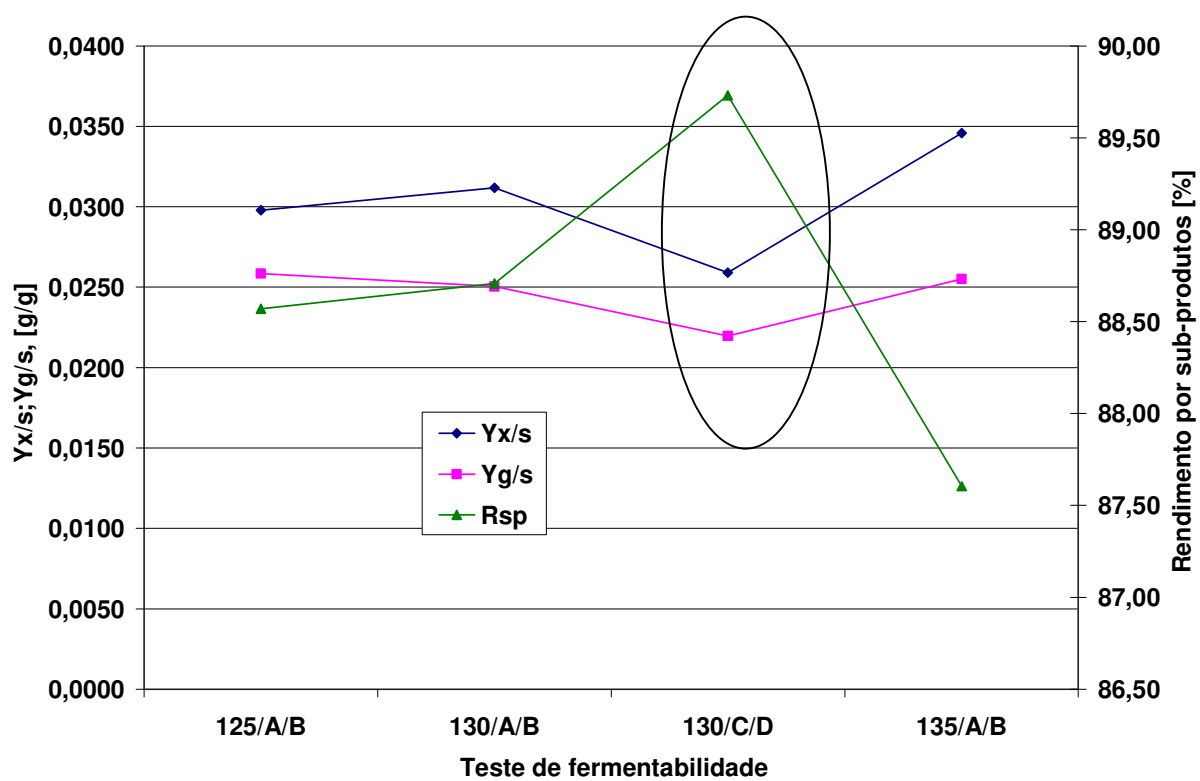


FIGURA-8. GRÁFICO DOS VALORES MÉDIOS DAS PRODUÇÕES ESPECÍFICAS DE BIOMASSA E GLICEROL E DO RENDIMENTO POR SUB-PRODUTOS, PARA A LINHAGEM LNF BG-1. (VALORES REPRESENTAM MÉDIA ARITMÉTICA DE 6 RESULTADOS).

1653

1654

1655

1656

1657

1658

1659

1660

1661

1662

1663 **ANEXO 1: Dados experimentais dos testes de fermentabilidade dos dostos**

1664 **tratados termicamente utilizando as linhagens LNF BG-1 e LNF SA-1.**

1665

1666

1667

1668

1669

1670

1671

1672

1673

1674

1675

1676

1677

1678

1679

1680

1681

1682

1683

1684

1685

1686

1687

TABELA-1. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA PRIMEIRA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 125C/30s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

	F125-1SA1	F125-1SA2	F125-1SA3	F125-1BG1	F125-1BG1	F125-1BG1
PESO VAZIO	164.61	167.33	163.63	167.84	165.65	165.47
PESO VAZIO + MOSTO	270.43	273.64	271.16	264.30	260.26	264.94
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO	280.34	283.55	281.05	274.20	270.14	274.77
PESO 24h	275.78	278.66	276.34	270.23	266.19	270.29
PESO 39h	270.95	273.97	271.60	266.27	262.44	265.81
PESO 42h	270.56	273.50	271.20	265.77	262.00	265.33
PESO 45h	270.14	273.04	270.79	265.29	261.58	264.9
PESO 47h	269.93	272.81	270.59	265.05	261.34	264.65
PESO 52h	269.80	272.67	270.46	264.20	260.50	264.53
massa de vinho fermentado	105.19	105.34	106.83	96.36	94.85	99.06
co2 produzido	10.54	10.88	10.59	10.00	9.64	10.24
MASSA SECA NO INÓCULO						
	S A 1	S A 2	S A 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	48.21	54.77	48.13	49.18	53.48	50.08
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0)	58.09	64.66	58.01	58.05	63.33	59.91
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1)	48.22	54.78	48.14	49.2	53.51	50.11
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2)	48.22	54.78	48.14	49.2	53.51	50.11
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3)	48.22	54.78	48.14	49.2	53.51	50.11
massa seca no inóculo (g)	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0.0010	0.0010	0.0010	0.0023	0.0030	0.0031
MASSA SECA VINHO FERMENTADO						
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO	61.91	61.26	61.83	63.18	61.68	62.48
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho	100.05	100.05	100.09	100.05	100.08	100.04
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	55.62	46.57	48.13	46.56	47.72	50.72
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0)	70.91	63.66	68.23	56.86	59.49	61.33
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1)	55.96	46.91	48.50	46.89	48.06	51.03
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2)	55.96	46.91	48.47	46.88	48.06	51.03
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3)	55.95	46.90	48.45	46.78	47.96	50.96
massa de amostra (g)	38.14	38.79	38.26	36.87	38.40	37.56
massa seca final no vinho (g)	0.33	0.33	0.32	0.22	0.24	0.237
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
INÓCULO						
X MS (%m/m)	0.1012	0.1011	0.1012	0.2255	0.3046	0.3052
VINHO						
ETOH(%m/m)	9.8	9.81	9.85	9.7	9.6	9.75
ARRT (%m/m)	0.14	0.11	0.10	0.14	0.14	0.14
GLICEROL (%m/m)	0.58	0.59	0.6	0.55	0.52	0.57
X MS (%m/m)	0.87	0.85	0.84	0.60	0.63	0.63
MOSTO						
ART(%m/m)	22.3			22.5		
ART MEDIA (%m/m)	22.4					
CÁLCULOS						
ETOH produzido (g)	10.31	10.33	10.52	9.35	9.11	9.66
ART inicial (g)	23.70	23.81	24.09	21.61	21.19	22.28
ART final (g)	0.15	0.12	0.11	0.14	0.13	0.14
ART consumido (g)	23.56	23.70	23.98	21.47	21.06	22.14
MS no vinho (g)	0.91	0.90	0.89	0.57	0.59	0.63
MS no inóculo (g)	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03
MX produzida (g)	0.90	0.89	0.88	0.55	0.56	0.60
GLICEROL produzido (g)	0.61	0.62	0.64	0.53	0.49	0.56

**TABELA-2. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA SEGUNDA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 125C/25s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F125-2SA1	F125-2SA2	F125-2SA3	F125-2BG1	F125-2BG2	F125-2BG3
PESO VAZIO	170,34	163,19	168,45	163,26	165,80	161,02
PESO VAZIO + MOSTO	274,13	267,86	267,81	268,11	268,93	263,34
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO	284,01	277,77	277,72	278,02	278,78	273,23
PESO 24h	279,30	273,06	273,01	274,02	274,79	269,23
PESO 39h	274,56	268,32	268,27	270,54	270,83	265,62
PESO 42h	274,16	267,92	267,87	269,43	269,53	264,50
PESO 45h	273,75	267,51	267,46	269,26	269,42	264,41
PESO 47h	273,55	267,31	267,26	269,19	269,40	264,40
PESO 52h	273,42	267,18	267,13	267,50	268,70	262,90
massa de vinho fermentado	103,08	103,99	98,68	104,24	102,90	101,88
co2 produzido	10,59	10,59	10,59	10,52	10,08	10,33
	MASSA SECA NO INÓCULO					
	S A 1	S A 2	S A 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	48,21	54,77	48,13	49,18	53,48	50,08
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0)	58,09	64,66	58,01	58,05	63,33	59,91
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1)	48,22	54,78	48,14	49,20	53,51	50,11
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2)	48,22	54,78	48,14	49,20	53,51	50,11
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3)	48,22	54,78	48,14	49,20	53,51	50,11
massa de inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,0010	0,0010	0,0010	0,0023	0,0030	0,0031
	MASSA SECA NO VINHO FERMENTADO					
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO	61,91	61,26	61,83	62,54	63,24	62,01
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho	100,05	100,05	100,09	100,05	100,04	100,06
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	55,62	46,57	48,13	48,55	50,54	55,06
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0)	70,91	63,66	68,23	76,74	80,95	93,03
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1)	55,96	46,91	48,50	48,85	50,86	55,38
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2)	55,96	46,91	48,47	48,85	50,86	55,38
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3)	55,90	46,86	48,40	48,85	50,82	55,34
massa de amostra (g)	38,14	38,79	38,26	37,51	36,80	38,05
massa seca final (g)	0,28	0,29	0,27	0,30	0,28	0,28
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,0073	0,0075	0,0071	0,0080	0,0076	0,0074
	INÓCULO					
X MS (%m/m)	0,1012	0,1011	0,1012	0,2255	0,3046	0,3052
VINHO						
ETOH( %m/m)	9,72	9,73	9,71	9,70	9,72	9,70
ARRT (%m/m)	0,14	0,11	0,10	0,14	0,14	0,14
GLICEROL (%m/m)	0,60	0,61	0,58	0,62	0,59	0,60
X MS (%m/m)	0,73	0,75	0,71	0,80	0,76	0,74
	MOSTO					
ART(%m/m)	22,00			22,50		
ART MÉDIA (%m/m)	22,25					
	CÁLCULOS					
ETOH produzido (g)	10,02	10,12	9,58	10,11	10,00	9,88
ART inicial (g)	23,09	23,29	22,11	23,33	22,95	22,77
ART final (g)	0,14	0,11	0,10	0,15	0,14	0,14
ART consumido (g)	22,95	23,17	22,01	23,18	22,80	22,62
MS no vinho (g)	0,76	0,78	0,70	0,83	0,78	0,75
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03
MX produzida (g)	0,75	0,77	0,69	0,81	0,75	0,72
GLICEROL produzido (g)	0,62	0,63	0,57	0,65	0,61	0,61

**TABELA-3. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA PRIMEIRA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 130C/9s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F130(9s)-1SA1	F130(9s)-1SA2	F130(9s)-1SA3	F130(9s)-1BG1	F130(9s)-1BG2	F130(9s)-1BG3
PESO VAZIO	166,50	163,20	165,62	163,50	166,98	171,21
PESO VAZIO + MOSTO	260,63	262,07	261,64	265,66	274,28	278,45
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO	270,51	272,01	271,59	275,51	284,20	288,37
PESO 52h	262,18	263,43	263,17	266,64	275,04	279,14
massa de vinho fermentado	95,68	100,23	97,55	103,14	108,06	107,93
co2 produzido	8,33	8,58	8,42	8,87	9,16	9,23
MASSA SECA NO INÓCULO						
	S A 1	S A 2	S A 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	46,45	49,78	52,32	45,46	47,57	49,83
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0)	56,27	59,09	62,28	55,38	57,58	59,84
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1)	46,46	49,79	52,33	45,47	47,58	49,84
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2)	46,46	49,79	52,33	45,47	47,58	49,84
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3)	46,46	49,79	52,33	45,47	47,58	49,84
massa de inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
MASSA SECA NO VINHO FERMENTADO						
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO	61,74	62,95	61,66	58,46	63,47	62,44
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho	100,03	100,02	100,02	100,03	100,03	100,02
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	54,14	56,2	54,02	52,28	55,29	57,53
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0)	90,49	93,39	96,62	103,01	97,15	99,22
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1)	54,36	56,39	54,23	52,56	55,55	57,79
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2)	54,36	56,39	54,23	52,56	55,55	57,79
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3)	54,36	56,39	54,23	52,56	55,55	57,79
massa de amostra (g)	38,29	37,07	38,36	41,57	36,56	37,58
massa seca final (g)	0,22	0,19	0,21	0,28	0,26	0,26
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,0057	0,0051	0,0055	0,0067	0,0071	0,0069
INÓCULO						
X MS (%m/m)	0,1018	0,1074	0,1004	0,1008	0,0999	0,0999
VINHO						
ETOH( %m/m)	8,5	8,44	8,4	8,72	8,56	8,44
ARRT (%m/m)	0,1	0,11	0,18	0,15	0,12	0,12
GLICEROL (%m/m)	0,48	0,53	0,51	0,51	0,49	0,49
X MS (%m/m)	0,5746	0,5125	0,5474	0,6736	0,7112	0,6919
MOSTO						
ART(%m/m)	19,5			20,1		
ART MÉDIA (%m/m)	19,8					
CÁLCULOS						
ETOH produzido (g)	8,13	8,46	8,19	8,99	9,25	9,11
ART inicial (g)	18,64	19,58	19,01	20,23	21,25	21,23
ART final (g)	0,10	0,11	0,18	0,15	0,13	0,13
ART consumido (g)	18,54	19,47	18,84	20,07	21,12	21,10
MS no vinho (g)	0,55	0,51	0,53	0,69	0,77	0,75
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MX produzida (g)	0,54	0,50	0,52	0,68	0,76	0,74
GLICEROL produzido (g)	0,46	0,53	0,50	0,53	0,53	0,53

**TABELA-4. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA SEGUNDA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 130C/9s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F130(9s)-2SA1	F130(9s)-2SA2	F130(9s)-2SA3	F130(9s)-2BG1	F130(9s)-2BG2	F130(9s)-2BG3
PESO VAZIO	167,58	164,69	171,27	164,55	163,36	163,43
PESO VAZIO + MOSTO	263,23	268,36	268,79	258,98	264,62	257,04
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO	273,15	278,30	278,85	268,96	274,53	267,01
PESO 52h	264,95	269,40	270,50	260,77	265,83	259,00
massa de vinho fermentado	97,37	104,71	99,23	96,22	102,47	95,57
co2 produzido	8,20	8,90	8,35	8,19	8,70	8,01
	MASSA SECA NO INÓCULO					
	S A 1	S A 2	S A 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	51,18	42,57	47,82	51,39	45,75	52,32
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0)	61,24	52,57	57,80	61,31	55,66	62,27
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1)	51,19	42,58	47,83	51,40	45,76	52,33
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2)	51,19	42,58	47,83	51,40	45,76	52,33
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3)	51,19	42,58	47,83	51,40	45,76	52,33
massa de inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
	MASSA SECA NO VINHO FERMENTADO					
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO	59,43	62,58	62,67	63,40	64,16	61,73
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho	100,03	100,01	100,01	100,03	100,01	100,01
PESO PLACA DE PETRI VAZIA	57,03	46,54	49,48	47,55	52,75	46,31
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0)	91,23	80,10	82,77	47,75	52,97	46,50
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1)	57,25	46,75	49,70	47,75	52,97	46,50
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2)	57,25	46,75	49,70	47,75	52,97	46,50
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3)	57,25	46,75	49,70	47,75	52,97	46,50
massa de amostra (g)	40,60	37,43	37,34	36,63	35,85	38,28
massa seca final (g)	0,22	0,21	0,22	0,20	0,22	0,19
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,0054	0,0056	0,0059	0,0055	0,0061	0,0050
	INÓCULO					
X MS (%m/m)	0,0994	0,1000	0,1002	0,1008	0,1009	0,1005
	VINHO					
ETOH( %m/m)	8,3	8,4	8,35	8,2	8,35	8,2
ARRT (%m/m)	0,11	0,12	0,18	0,18	0,12	0,15
GLICEROL (%m/m)	0,48	0,5	0,49	0,5	0,48	0,47
X MS (%m/m)	0,5419	0,5610	0,5892	0,5460	0,6137	0,4963
	MOSTO					
ART(%m/m)	19,20			19,50		
ART MÉDIA (%m/m)	19,35					
	CÁLCULOS					
ETOH produzido (g)	8,08	8,80	8,29	7,89	8,56	7,84
ART inicial (g)	18,51	20,06	18,87	18,27	19,59	18,11
ART final (g)	0,11	0,13	0,18	0,17	0,12	0,14
ART consumido (g)	18,40	19,93	18,69	18,10	19,47	17,97
MS no vinho (g)	0,53	0,59	0,58	0,53	0,63	0,47
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MX produzida (g)	0,52	0,58	0,57	0,52	0,62	0,46
GLICEROL produzido (g)	0,47	0,52	0,49	0,48	0,49	0,45

**TABELA-5. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA PRIMEIRA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 130C/30s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F130(30s)-1SA1	F130(30s)-1SA2	F130(30s)-1SA3	F130(30s)-1BG1	F130(30s)-1BG1	F130(30s)-1BG1
PESO VAZIO (g)	165,63	168,90	161,10	163,62	167,78	162,55
PESO VAZIO + MOSTO (g)	264,36	269,91	265,43	263,68	267,95	272,15
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO (g)	274,13	279,68	275,14	273,46	277,77	282,00
PESO 52h (g)	265,13	270,55	265,63	264,31	268,59	271,97
massa de vinho fermentado (g)	99,50	101,65	104,53	100,69	100,81	109,42
CO2 produzido (g)	9,00	9,13	9,51	9,15	9,18	10,03
MASSA SECA DO INÓCULO	MASSA SECA DO INÓCULO					
	SA 1	SA 2	SA 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	47,68	55,71	48,79	47,36	50,27	40,56
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0) (g)	57,38	65,45	58,53	57,13	60	50,29
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1) (g)	47,69	55,72	48,8	47,37	50,28	40,57
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2) (g)	47,69	55,72	48,8	47,37	50,28	40,57
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3) (g)	47,69	55,72	48,8	47,37	50,28	40,57
massa de inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,00103	0,00103	0,00103	0,00102	0,00103	0,00103
	MASSA SECA FINAL					
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO (g)	61,66	61,66	62,95	63,28	63,21	57,71
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho (g)	101,21	101,19	101,23	101,21	101,21	101,22
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	53,31	47,37	56,79	39,09	48,4	56,98
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0) (g)	93,99	91,61	97,75	85,29	91,65	114,04
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1) (g)	53,58	47,62	57,05	39,33	48,65	57,25
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2) (g)	53,58	47,62	57,05	39,33	48,65	57,25
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3) (g)	53,58	47,62	57,05	39,33	48,65	57,25
massa de amostra (g)	39,55	39,53	38,28	37,93	38	43,51
massa seca final (g)	0,27	0,25	0,26	0,24	0,25	0,27
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,00683	0,00632	0,00679	0,00633	0,00658	0,00621
	INÓCULO					
X MS (%m/m)	0,103	0,103	0,103	0,102	0,103	0,103
	VINHO					
ETOH( %m/m)	9,2	9,2	9,25	9,15	9,22	9,25
ARRT (%m/m)	0,12	0,16	0,15	0,16	0,14	0,16
GLICEROL (%m/m)	0,46	0,46	0,44	0,46	0,45	0,42
X MS (%m/m)	0,68	0,63	0,68	0,63	0,66	0,62
	MOSTO					
ART(%m/m)	21,26			20,93		
ART MÉDIA (%m/m)	21,10					
	CÁLCULOS					
ETOH produzido (g)	9,15	9,35	9,67	9,21	9,29	10,12
ART inicial (g)	20,83	21,31	22,01	21,11	21,13	23,12
ART final (g)	0,12	0,16	0,16	0,16	0,14	0,18
ART consumido (g)	20,71	21,15	21,85	20,95	20,99	22,95
MS no vinho (g)	0,68	0,64	0,71	0,64	0,66	0,68
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MX produzida (g)	0,67	0,63	0,70	0,63	0,65	0,67
GLICEROL produzido (g)	0,46	0,47	0,46	0,46	0,45	0,46



**TABELA-6. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA SEGUNDA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 130C/30s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F130(30s)-2SA1	F130(30s)-2SA2	F130(30s)-2SA3	F130(30s)-2BG1	F130(30s)-2BG2	F130(30s)-2BG3
PESO VAZIO (g)	164,81	165,84	169,23	166,14	166,71	164,20
PESO VAZIO + MOSTO (g)	269,91	261,8	276,32	271,44	263,45	267,51
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO (g)	279,5	271,4	285,92	281,13	273,06	277,12
PESO 52h (g)	269,82	262,85	276,27	271,61	264,44	267,78
massa de vinho fermentado (g)	105,01	97,01	107,04	105,47	97,73	103,58
CO2 produzido (g)	9,68	8,55	9,65	9,52	8,62	9,34
	MASSA SECA DO INÓCULO					
	SA 1	SA 2	SA 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	50,51	47,45	48,98	52,78	46,51	50,57
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0) (g)	60,09	57,02	58,52	62,4	56,09	60,17
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1) (g)	50,52	47,46	48,99	52,79	46,52	50,58
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2) (g)	50,52	47,46	48,99	52,79	46,51	50,58
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3) (g)	50,52	47,46	48,99	52,79	46,52	50,58
massa de inóculo (g)	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
	MASSA SECA FINAL					
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO (g)	62,51	62,79	61,34	62	62,93	62,1
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho (g)	102,5	102,5	102,51	102,5	102,77	102,78
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	47,69	47,32	56,67	55,52	45,49	49,07
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0) (g)	100,08	92,67	112,05	112,34	100,82	104,66
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1) (g)	47,89	47,51	56,9	55,72	45,65	49,26
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2) (g)	47,89	47,51	56,9	55,72	45,65	49,26
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3) (g)	47,89	47,51	56,9	55,72	45,65	49,26
massa de amostra (g)	39,99	39,71	41,17	40,5	39,84	40,68
massa seca final (g)	0,2000	0,1900	0,2300	0,2000	0,1600	0,1900
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,0050	0,0048	0,0056	0,0049	0,0040	0,0047
	INÓCULO					
X MS (%m/m)	0,1044	0,1045	0,1048	0,1040	0,1044	0,1042
	VINHO					
ETOH( %m/m)	9,01	8,88	8,96	9	8,84	9,01
ARRT (%m/m)	0,13	0,13	0,16	0,12	0,19	0,18
GLICEROL (%m/m)	0,49	0,46	0,44	0,46	0,47	0,46
X MS (%m/m)	0,50	0,48	0,56	0,49	0,40	0,47
	MOSTO					
ART(%m/m)	21,37			20,00		
ART MÉDIA (%m/m)	20,69					
	CÁLCULOS					
ETOH produzido (g)	9,46	8,61	9,59	9,49	8,64	9,33
ART inicial (g)	21,74	19,85	22,15	21,78	20,01	21,37
ART final (g)	0,14	0,13	0,17	0,13	0,19	0,19
ART consumido (g)	21,60	19,72	21,98	21,65	19,82	21,18
MS no vinho (g)	0,53	0,46	0,60	0,52	0,39	0,48
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MX produzida (g)	0,52	0,45	0,59	0,51	0,38	0,47
GLICEROL produzido (g)	0,51	0,45	0,47	0,49	0,46	0,48

**TABELA-7. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA PRIMEIRA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 135C/3.8s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F135-1SA1	F135-1SA2	F135-1SA3	F135-1BG1	F135-1BG1	F135-1BG1
PESO VAZIO (g)	161,70	154,92	163,77	167,67	168,73	165,92
PESO VAZIO + MOSTO (g)	270,03	259,30	269,29	268,48	275,77	272,46
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO (g)	279,78	269,01	279,04	278,20	285,89	282,87
PESO 52h (g)	268,67	258,42	268,42	267,79	274,67	271,45
massa de vinho fermentado (g)	106,97	103,50	104,65	100,12	105,94	105,53
CO2 produzido (g)	11,11	10,59	10,62	10,41	11,22	11,42
	MASSA SECA DO INÓCULO					
	S A 1	S A 2	S A 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	41,03	56,77	43,28	49,68	49,07	49,21
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0) (g)	50,75	66,51	53,07	59,47	58,87	58,93
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1) (g)	41,04	56,78	43,29	49,69	49,08	49,22
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2) (g)	41,04	56,78	43,29	49,69	49,08	49,22
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3) (g)	41,04	56,78	43,29	49,69	49,08	49,22
massa de inóculo (g)	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
	MASSA SECA FINAL					
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO (g)	61,94	61,63	62,24	62,94	61,54	62,15
PESO TUBO CENTRIGUGA VAZIO + vinho (g)	100,00	99,99	99,99	100,08	100,06	99,98
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	50,33	47,77	63,37	56,96	54,67	56,39
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0) (g)	93,70	80,16	100,02	105,89	100,97	97,49
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1) (g)	50,57	48,01	63,62	57,24	54,96	56,68
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2) (g)	50,57	48,01	63,62	57,24	54,96	56,68
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3) (g)	50,57	48,01	63,62	57,24	54,96	56,68
massa de amostra (g)	38,06	38,36	37,75	37,14	38,52	37,83
massa seca final (g)	0,24	0,24	0,25	0,28	0,29	0,29
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,0063	0,0063	0,0066	0,0075	0,0075	0,0077
	INÓCULO					
X MS (%m/m)	0,1029	0,1027	0,1021	0,1021	0,1020	0,1029
	VINHO					
ETOH( %m/m)	10,06	10,1	9,93	10,01	10,04	10,05
ARRT (%m/m)	0,13	0,14	0,12	0,13	0,15	0,17
GLICEROL (%m/m)	0,5	0,5	0,49	0,54	0,55	0,53
X MS (%m/m)	0,63	0,63	0,66	0,75	0,75	0,77
	MOSTO					
ART(%m/m)	22,5			22,85		
ART MÉDIA (%m/m)	22,68					
	CÁLCULOS					
ETOH produzido (g)	10,76	10,45	10,39	10,02	10,64	10,61
ART inicial (g)	24,56	23,67	23,93	22,86	24,27	24,16
ART final (g)	0,14	0,14	0,13	0,13	0,16	0,18
ART consumido (g)	24,42	23,52	23,80	22,73	24,11	23,98
MS no vinho (g)	0,67	0,65	0,69	0,75	0,80	0,81
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MX produzida (g)	0,66	0,64	0,68	0,74	0,79	0,80
GLICEROL produzido (g)	0,53	0,52	0,51	0,54	0,58	0,56

**TABELA-8. DADOS EXPERIMENTAIS DOS TESTES DE FERMENTABILIDADE DA SEGUNDA REPETIÇÃO DO MOSTO TRATADO TERMICAMENTE EM DUPLICATA SEGUNDO O BINÔMIO 135C/3.8s, UTILIZANDO AS LINHAGENS LNF BG1 E LNF SA1. OS ENSAIOS DE FERMENTABILIDADE FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA PARA CADA LINHAGEM DE LEVEDURA E PARA CADA UM DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS QUE FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.**

	F135-2SA1	F135-2SA2	F135-2SA3	F135-2BG1	F135-2BG2	F135-2BG3
PESO VAZIO (g)	161,81	168,49	168,40	168,03	168,31	164,95
PESO VAZIO + MOSTO (g)	269,56	268,19	271,17	272,08	278,63	279,47
PESO VAZIO + MOSTO + INÓCULO (g)	279,51	278,12	281,14	282,04	288,57	289,41
PESO 52h (g)	268,77	268,27	271,00	271,80	277,69	278,40
massa de vinho fermentado (g)	106,96	99,78	102,60	103,77	109,38	113,45
CO2 produzido (g)	10,74	9,85	10,14	10,24	10,88	11,01
	MASSA SECA DO INÓCULO					
	S A 1	S A 2	S A 3	BG 1	BG 2	BG 3
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	47,84	47,36	47,66	57,76	47,3	52,95
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (0) (g)	57,71	57,32	57,57	67,69	57,18	62,82
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (1) (g)	47,85	47,37	47,67	57,77	47,31	52,96
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (2) (g)	47,85	47,37	47,67	57,77	47,31	52,96
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + INÓCULO (3) (g)	47,85	47,37	47,67	57,77	47,31	52,96
massa de inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
conc de fermento (g fermento ms/g de inóculo)	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
	MASSA SECA FINAL					
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO (g)	61,57	62,15	62,06	62,80	61,70	62,95
PESO TUBO CENTRIFUGA VAZIO + vinho (g)	100,00	99,99	99,99	100,00	100,02	100,00
PESO PLACA DE PETRI VAZIA (g)	56,96	51,86	46,41	50,10	49,07	51,73
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (0) (g)	120,32	112,60	112,36	104,71	111,67	111,22
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (1) (g)	57,23	52,18	46,68	50,39	49,40	52,05
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (2) (g)	57,23	52,18	46,68	50,39	49,40	52,05
PESO PLACA DE PETRI VAZIA + FERMENTO (3) (g)	57,23	52,18	46,68	50,39	49,40	52,04
massa de amostra (g)	38,43	37,84	37,93	37,20	38,32	37,05
massa seca final (g)	0,27	0,32	0,27	0,29	0,33	0,31
conc de fermento (g fermento ms/g de amostra)	0,0070	0,0085	0,0071	0,0078	0,0086	0,0084
	INÓCULO					
X MS (%m/m)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
	VINHO					
ETOH( %m/m)	9,91	9,83	9,88	10,27	9,75	9,44
ARRT (%m/m)	0,13	0,14	0,15	0,16	0,14	0,17
GLICEROL (%m/m)	0,58	0,59	0,58	0,62	0,6	0,62
X MS (%m/m)	0,70	0,85	0,71	0,78	0,86	0,84
	MOSTO					
ART(%m/m)	22,3			22,7		
ART MÉDIA (%m/m)	22,5					
	CÁLCULOS					
ETOH produzido (g)	10,60	9,81	10,14	10,66	10,66	10,71
ART inicial (g)	24,24	22,43	23,12	23,41	24,82	25,77
ART final (g)	0,14	0,14	0,15	0,17	0,15	0,19
ART consumido (g)	24,10	22,29	22,97	23,25	24,67	25,57
MS no vinho (g)	0,75	0,84	0,73	0,81	0,94	0,95
MS no inóculo (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
MX produzida (g)	0,74	0,83	0,72	0,80	0,93	0,94
GLICEROL produzido (g)	0,62	0,59	0,60	0,64	0,66	0,70

2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030  
2031  
2032  
2033  
2034  
2035  
2036  
2037  
2038  
2039  
2040  
2041  
  
2042  
  
2043  
  
2044  
  
2045  
  
2046  
  
2047  
  
2048  
  
2049  
  
2050

**ANEXO 2: Banco de dados Controle Mútuo utilizado no âmbito das Usinas associadas ao Centro de Tecnologia Canavieira com dados da safra de 2005**

**TABELA-1. DADOS DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DE ATÉ 64 UNIDADES PRODUTORAS, SAFRA 2005, CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA.**

<i>Processo Álcool</i>										
<i>k Ácido</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,0133	0,0156	0,0175	0,0183	0,0157	0,0216	0,0257	0,0208	0,0247	0,0193
Mínimo	-0,023	-0,007	-0,021	-0,039	-0,03	-0,03	-0,024	-0,024	-0,003	-0,0053
Máximo	0,0463	0,0968	0,1398	0,0654	0,0825	0,1308	0,143	0,0941	0,058	0,0795
Desvio Padrão	0,0143	0,0215	0,0317	0,0219	0,0224	0,0264	0,0338	0,0221	0,0204	0,0194
Usinas	27	37	38	38	38	38	38	34	12	39
<i>k Glicerol</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,0579	0,0607	0,0602	0,0605	0,0576	0,0588	0,0592	0,064	0,0503	0,0596
Mínimo	0,021	0,02	0,033	0,038	0,036	0,038	0,024	0,0416	0,01	0,0409
Máximo	0,1516	0,084	0,0885	0,117	0,078	0,083	0,077	0,11	0,0695	0,0772
Desvio Padrão	0,0229	0,0127	0,012	0,0152	0,0111	0,0116	0,0114	0,0154	0,0148	0,0092
Usinas	26	35	35	36	37	37	36	31	12	37
<i>k Levedura</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,0385	0,0429	0,041	0,0448	0,0442	0,042	0,0402	0,0419	0,046	0,0428
Mínimo	0,0095	0,0146	0,0109	0,008	0,0106	0,0107	0,0107	0,0098	0,024	0,0143
Máximo	0,112	0,1152	0,11	0,1107	0,1162	0,1077	0,132	0,1223	0,1255	0,1116
Desvio Padrão	0,0236	0,022	0,0211	0,0219	0,0245	0,0214	0,0257	0,0218	0,0312	0,0205
Usinas	27	37	38	38	38	38	38	34	12	39
<i>k ART</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,0385	0,0344	0,0363	0,0328	0,0312	0,0325	0,0353	0,0338	0,053	0,0342
Mínimo	0,0012	0,0017	0,0016	0,0006	0,0014	0,0043	0,0013	0,0026	0,0024	0,0019
Máximo	0,1327	0,0759	0,106	0,098	0,111	0,095	0,161	0,132	0,3772	0,0844
Desvio Padrão	0,0317	0,0173	0,0242	0,0202	0,0229	0,0189	0,03	0,0253	0,1003	0,0173
Usinas	26	37	38	38	39	39	37	33	12	39
<i>Teor Fermento no Vinho (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	8,84	10,6	10,89	11,08	11,05	10,9	10,4	10,19	9,1	10,66
Mínimo	2,68	2,83	6,07	6,78	6,85	6,54	6,2	4,76	5,16	7,59
Máximo	15,31	17,57	19,26	20,77	21,9	20,31	19,03	17,42	15,84	19,22
Desvio Padrão	2,51	2,51	2,56	2,82	2,78	2,58	2,49	2,58	2,37	2,35
Usinas	41	60	63	63	63	63	62	54	25	64
<i>Tempo Fermentação (h)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	9,42	8,83	8,74	8,62	8,68	9,27	9,02	8,62	9,15	8,88
Mínimo	6	4	4	4	4	4	4	4	6,88	4
Máximo	24,65	18	15	13,22	14,84	21,08	15	14,74	15,34	14,52
Desvio Padrão	3,39	2,37	2,12	1,94	2,05	2,67	2,39	2,05	2,34	2,01
Usinas	37	52	54	54	55	55	53	46	20	55

**TABELA-2. DADOS DE PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DE ATÉ 63 UNIDADES PRODUTORAS, SAFRA 2005, CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA.**

<i>Processo Álcool</i>										
<i>Viabilidade Dorna Morta (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	91,96	81,97	81,01	83,09	81,93	79,46	75,88	77,75	79,81	80,65
Mínimo	57,71	43,5	47,44	40,34	46,18	49,46	40	40	40	40,34
Máximo	99,12	97,85	95,49	96,3	95,49	92,67	95,99	91,06	94,9	94,28
Desvio Padrão	8,6	11,58	10,63	11,75	11,6	10,11	11,98	11,04	14,05	10,88
Usinas	40	56	59	60	59	59	58	49	21	60
<i>Grau Alcoólico do Vinho (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	7,76	8,03	8,25	8,45	8,69	8,66	8,43	8,15	7,36	8,36
Mínimo	4,83	4,82	5,31	5,82	5,55	5,98	5,49	5,65	4,89	5,52
Máximo	10,04	10,75	11,05	11,21	11,51	12,4	11,68	11,42	11,51	11,11
Desvio Padrão	1,14	1,2	1,21	1,12	1,22	1,19	1,23	1,22	1,42	1,08
Usinas	42	59	62	62	62	62	61	53	23	62
<i>Razão Infecção Dorna (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	19,23	18,77	17,2	17,02	29,32	31,26	32,32	36,41	63,97	30,99
Mínimo	0,06	0,03	0	0	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	0,05
Máximo	210	172	131,49	125,11	187,02	212,65	184,42	234,46	189,3	151,18
Desvio Padrão	51,73	37,41	32,92	31,69	41,81	44,82	42,46	46,26	58,7	39,42
Usinas	19	28	30	29	42	44	43	38	14	44
<i>Relação Vinhaça/Álcool (l/l)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	12,65	12,2	11,9	11,88	11,62	11,4	11,69	11,76	13,25	11,9
Mínimo	8,85	7,6	7,4	8,24	7,99	6,64	7,61	7,56	6,95	8,06
Máximo	20,22	16,77	18,81	15,81	17,09	16,47	16	18,75	20,21	17,48
Usinas	39	55	58	60	61	62	60	52	23	63
<i>Teor de Álcool na Vinhaça (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,0489	0,0401	0,0432	0,0357	0,0291	0,0291	0,0306	0,0297	0,0249	0,0358
Mínimo	0,004	0,0016	0,001	0	0	0	0	0	0	0,0024
Máximo	0,433	0,4	0,62	0,55	0,29	0,32	0,26	0,27	0,06	0,337
Desvio Padrão	0,068	0,0579	0,0867	0,071	0,0476	0,0501	0,0385	0,0438	0,0127	0,0427
Usinas	44	60	64	64	64	64	62	54	22	63
<i>Produtividade Fermentação (get/gfh)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,29	0,31	0,32	0,31	0,33	0,32	0,35	0,35	0,31	0,32
Mínimo	0,11	0,12	0,1	0,09	0,08	0,08	0,11	0,15	0,16	0,1
Máximo	0,49	0,64	0,61	0,63	0,63	0,53	0,59	0,74	0,47	0,63
Desvio Padrão	0,09	0,1	0,1	0,09	0,09	0,09	0,1	0,11	0,08	0,08
Usinas	33	49	52	52	53	53	51	43	19	53



**TABELA-3. DADOS DE EFICIÊNCIAS E PERDAS SETORIAIS NO PROCESSAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR DE ATÉ 65 UNIDADES PRODUTORAS, SAFRA 2005, CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA.**

<i>Eficiências e Perdas</i>										
<i>Perda Lavagem Cana (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,44	0,46	0,45	0,37	0,32	0,28	0,36	0,46	0,72	0,47
Mínimo	0	0	0,03	0,02	0	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
Máximo	3,2	2,32	2,32	1,69	3,63	1,42	2,41	1,62	2,72	1,77
Desvio Padrão	0,67	0,64	0,56	0,5	0,69	0,42	0,51	0,43	0,69	0,51
Usinas	29	39	39	36	37	37	38	33	14	41
<i>Perda Extração (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	3,83	3,62	3,53	3,55	3,59	3,76	3,99	4,29	4,67	3,73
Mínimo	2,58	2,38	2,4	2,5	2,62	2,77	2,88	3,13	2,02	2,81
Máximo	8,28	6,76	6,41	5,86	6,25	7,59	8,71	8,66	8,79	7,05
Desvio Padrão	1,17	1,03	0,86	0,79	0,83	0,92	0,99	1,06	1,72	0,85
Usinas	45	62	65	65	65	65	64	55	25	65
<i>Perda na Torta (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,54	0,53	0,54	0,51	0,48	0,53	0,59	0,64	0,71	0,54
Mínimo	0,08	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02	0,06	0,07	0,06
Máximo	1,04	1,29	1,37	1,15	1,14	1,47	1,61	1,78	2,75	1,04
Desvio Padrão	0,2	0,23	0,23	0,23	0,22	0,27	0,3	0,35	0,59	0,22
Usinas	41	56	60	62	62	63	62	54	25	63
<i>Perda na Fermentação (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	5,52	5,17	4,91	5,19	4,95	4,94	5,27	5,31	7,98	5,17
Mínimo	1,95	2,23	1,92	1,7	1,3	1,44	1,52	1,82	2,98	1,98
Máximo	16,87	18,6	19,76	19,25	16,9	16,29	16,29	14,18	15,8	16,45
Desvio Padrão	3,08	3,65	3,25	3,36	3,21	2,76	3,04	2,76	3,14	2,95
Usinas	40	59	62	62	62	63	61	50	21	63
<i>Perda na Destilação (devido a vinhaça) (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	0,22	0,2	0,19	0,16	0,14	0,14	0,21	0,21	0,22	0,18
Mínimo	0,03	0,01	0	0,01	0	0,01	0,01	0,02	0,04	0,01
Máximo	0,78	1,93	3,07	0,98	0,99	0,89	2,66	2,87	1,05	1,07
Desvio Padrão	0,16	0,29	0,41	0,16	0,15	0,14	0,35	0,43	0,21	0,19
Usinas	37	54	57	58	60	61	59	50	20	63
<i>Perdas Indeterminadas (%)</i>										Média
	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	5,08	3,84	3,22	3,3	3,07	4,08	4,28	4,57	8,01	4,05
Mínimo	-2,16	-5,47	-4,96	-4,92	-5,95	-2,7	-5,35	-5,7	-7,91	-3,87
Máximo	18,07	17,94	12,68	11,35	11,9	17,27	14,66	13,97	18,11	12,54
Desvio Padrão	5,4	4,34	3,11	2,94	3,16	3,7	3,88	4,05	7,07	3,01
Usinas	35	54	58	58	58	59	57	46	17	61

**TABELA-4. DADOS DE EFICIÊNCIAS E PERDAS SETORIAIS NO PROCESSAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR DE ATÉ 65 UNIDADES PRODUTORAS, SAFRA 2005, CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA.**

<b>Eficiências e Perdas</b>										
<b>Extração de Pol (%)</b>										<b>Média</b>
	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	96,17	96,39	96,48	96,45	96,41	96,24	96,01	95,72	95,33	96,26
Mínimo	91,72	93,24	93,59	94,14	93,75	92,41	91,29	91,34	91,21	92,95
Máximo	97,42	97,62	97,6	97,5	97,38	97,23	97,12	96,87	97,98	97,19
Desvio Padrão	1,19	1,04	0,87	0,79	0,83	0,92	1	1,08	1,72	0,85
Usinas	44	61	64	64	65	65	63	53	25	65
<b>Extração de Pol (valor digitado) (%)</b>										<b>Média</b>
	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	96,21	96,39	96,47	96,44	96,43	96,24	96,04	95,73	95,1	96,27
Mínimo	91,87	93,23	93,63	94,2	93,8	92,53	91,47	91,18	90,27	93
Máximo	97,47	97,61	97,61	97,53	97,37	97,31	97,17	97,09	97,99	97,23
Desvio Padrão	1,1	1,07	0,87	0,8	0,83	0,92	0,99	1,07	1,74	0,86
Usinas	42	60	63	63	63	63	62	52	23	63
<b>Extração Reduzida de Deerr (%)</b>										<b>Média</b>
	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	96,07	96,29	96,41	96,4	96,41	96,4	96,31	96,11	95,9	96,33
Mínimo	92,81	93,1	93,79	94,11	93,64	93,33	92,78	92,57	92,83	93,8
Máximo	97,5	97,6	97,46	97,47	97,25	97,33	97,27	97,34	98,15	97,24
Desvio Padrão	0,92	0,94	0,83	0,79	0,83	0,87	0,86	1	1,32	0,81
Usinas	44	61	64	64	65	65	63	53	25	65
<b>Rendimento Fermentativo (valor digitado) (%)</b>										<b>Média</b>
	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	89,6	89,73	89,72	89,68	89,67	89,87	89,55	89,95	89,07	89,71
Mínimo	65,27	66,25	76,32	78,76	79,05	80,09	78	77	78,44	80,34
Máximo	94,44	94,91	93,79	93,94	93,14	93,27	93,13	98,27	93,25	93,17
Desvio Padrão	5,87	4,32	3,48	3,16	3,2	2,78	3,16	4,08	3,63	2,79
Usinas	40	58	61	61	60	61	60	49	20	62
<b>Rendimento Fermentativo (calculado por k) (%)</b>										<b>Média</b>
	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	90,78	90,44	90,6	90,24	90,58	90,42	90,29	90,19	89,54	90,37
Mínimo	80,33	83,44	84,18	83,91	84,76	84,25	78,62	83,12	78,06	83,28
Máximo	93,32	93,61	93,84	93,99	94,4	93,32	93,28	93,61	95,53	93,48
Desvio Padrão	3,23	2,39	2,41	2,34	2,14	2,33	3,21	2,39	4,74	2,1
Usinas	25	35	35	36	36	36	35	31	12	37
<b>Eficiência Industrial (%)</b>										<b>Média</b>
	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Média
Média	85,24	87,21	87,92	87,89	88,23	87,1	86,56	85,29	80,49	87,15
Mínimo	67,2	53,05	63,43	71,66	76,06	74,55	74,18	68,48	68	74,03
Máximo	94,51	94,04	93,67	92,32	94,37	93,14	96,62	94,06	98,91	92,36
Desvio Padrão	6,22	6,62	5,25	3,87	3,61	3,8	4,54	4,91	6,7	3,76
Usinas	42	61	65	65	64	65	63	52	21	65



# Capítulo 5

## CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES

## Conclusões gerais

- Todos os tratamentos térmicos resultaram em preservação dos açúcares do mosto superior a 98,7% mesmo os processos mais drásticos que resultaram em valor de  $n_{\text{integral-biológico}} > 5$ . Este fato mostrou que, nas temperaturas escolhidas, as curvas de preservação da sacarose e dos ART estão a distância segura da curva TDT para destruição dos esporos de *G. stearothermophilus*.
- Embora a zona de otimização do processo térmico englobe ampla faixa de temperaturas, na prática a zona delimitada a partir da temperatura de 120°C deve ser escolhida por razões de segurança quanto à preservação dos açúcares, porque abaixo dessa temperatura diminui a região otimizada, ou seja, diminui a distância entre os limites inferior e superior da zona de tratamento otimizada.
- Os processos térmicos poderão ser definidos quanto ao seu objetivo em termos de número de reduções decimais desejada no micro-organismo alvo, em conjunto com informações relativas à concentração de esporos termófilos no mosto à saída do decantador, a qual parece estar relacionada com questões de clima regional e características de capacidade de retenção de água do solo.
- Esta pesquisa mostrou que é possível otimizar a retenção de açúcares durante o tratamento térmico de mostos. Este fato tem grande impacto na cadeia tecnológica de produção de bioetanol porque fornece as bases para o desenvolvimento de um processo livre de antibióticos.

- Os testes de fermentabilidade adaptados se mostraram simples, mas, fornecem muitas informações adicionais e podem ser uma ferramenta útil na otimização clássica de mostos tratados termicamente, que neste caso foi baseada unicamente na destruição térmica do micro-organismo alvo e preservação dos açúcares pelo fato de que o mosto representa uma matriz complexa de macro e micro nutrientes essenciais que podem ser afetados pelo tratamento térmico e se tornarem indisponíveis para as leveduras da fermentação.
- Rendimento da fermentação máximo foi encontrado para as duas linhagens testadas usando mosto submetido a processo térmico equivalente ao tratamento com o binômio 130°C/37s, uma condição intermediária entre as condições testadas. Esse binômio de tratamento térmico, como em todos os demais testados, preservou os açúcares do mosto acima de 98,7%. Extrapolações dessa condição de binômio obtida na unidade piloto Microthermics® deve ser feita comparando a letalidade.
- Os testes de fermentabilidade apresentaram rendimento compatível com os rendimentos industriais informados por unidades produtoras. Se fossem muito diferentes seria por razões de disponibilidade de nutrientes e não pela presença de contaminantes.

### **Recomendações para continuidade em trabalhos futuros**

Configurar os testes de fermentabilidade dos mostos tratados termicamente incluindo o reciclo de células para avaliar a exposição contínua e prolongada das leveduras aos mostos tratados termicamente.

Na preparação do inóculo, realizar várias passagens em meio mineral para minimizar o estresse decorrente de um inóculo em Batata Dextrose Agar, passar direto para fermentação. Sugere-se então o uso de um meio mineral, por exemplo, um meio de cultura de caldo de cana suplementado com nutrientes minerais, sais de fosfato e amônio, esterilizados por microfiltração.

Devido o potencial efeito do pH na precipitação de metais, outra recomendação importante, seria introduzir como variável em estudos futuros, a influência do pH durante o tratamento térmico, considerando que o pH abaixo de 6.5, embora aumente o desdobramento da sacarose em glicose e frutose, não implicaria em degradação dos monossacarídeos formados. Não haveria impacto negativo no rendimento da fermentação nem na produtividade pois o primeiro passo metabólico é a inversão da sacarose com invertase cujos níveis na fermentação alcoólica são comprovadamente baixos. O grande ganho poderia estar na estabilidade dos micronutrientes a pH menor.

Considerando a otimização baseada no micro-organismo alvo e os açúcares desta pesquisa, trabalhos futuros deveriam então abordar o impacto sobre os micronutrientes e identificar quais são mais relevantes e como deveriam ser preservados para desenvolver uma curva TDT para os micronutrientes acessíveis.