

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DEPARTAMENTO DE PROCESSOS
BIOTECNOLÓGICOS



UNICAMP

**ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO CONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL UTILIZANDO CÉLULAS AUTO-IMOBILIZADAS EM REATORES TIPO
TORRE**

Autor: Gabriel Ramos Galassi
Orientador: Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química

Campinas – São Paulo
Junho/2007

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: G131e
T/UNICAMP
V. _____ EX _____
TOMBO BCCL 76468
PROC 16.129-08
C 0 X
PREÇO 11,00
DATA 22-04-08
BIB-ID 432217

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

G131e Galassi, Gabriel Ramos
Estudo do processo fermentativo contínuo para produção de etanol utilizando células auto-imobilizadas em reatores tipo torre / Gabriel Ramos Galassi. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Sílvio Roberto Andrietta
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação alcoólica. 2. Reatores químicos. 3. Leveduras (Fungos) – Engenharia genética. 3. Leveduras. 4. Floculação. 5. Células de flotação. I. Andrietta, Sílvio Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Study of continuous fermentation process for ethanol production using self-immobilized cells in fixed bed tower reactors

Palavras-chave em Inglês: Continuous alcoholic fermentation, Tower reactors, Flocculation yeast, Self-immobilized yeast cell

Área de concentração: Desenvolvimento de processos Biotecnológicos

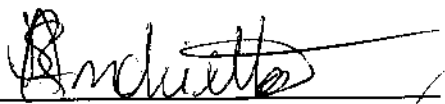
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Cláudia Steckelberg

Data da defesa: 29/06/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Gabriel Ramos Galassi e aprovada em 29 de junho de 2007 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

(ORIENTADOR)



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Perelra

(Titular)



Prof. Dra. Claudia Steckelberg

(Titular)

Este exemplar corresponde a versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Gabriel Ramos Galassi e aprovada pela Comissão Julgadora em 29/06/2007.



Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta
(ORIENTADOR)

AGRADECIMENTOS

- A Deus
- Ao Professor Dr. Sílvio Andrietta pela orientação e amizade
- Ao CNPQ pelo financiamento deste projeto
- Aos meus pais e irmão que sempre me apoiaram em momentos de dificuldade ou descrença
- A Roberta pelo companheirismo e paciência
- Aos amigos do CPQBA: Cláudia, Graça, Gisele, Erika, Milene e Klauss pela amizade e ajuda direta ou indireta neste projeto
- Aos amigos da FEQ: João Paulo, Luciana, Igor e Edgar
- Ao CPQBA pelo suporte
- Aos professores participantes da banca examinadora
- A Silvia (laboratório de Genômica e Expressão) pelo auxílio

“O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, ao menos, coisas admiráveis”

Dale Carnegie

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Histórico	3
2.2 – Processos fermentativos	5
2.2.1 – Batelada	5
2.2.2 – Batelada alimentada	6
2.2.3 – Processo contínuo	6
2.2.3.1 – Tipos de reatores	8
2.3 – Biorreatores de leito fixo	9
2.4 – Bioquímica da fermentação alcoólica	11
2.5 – O fenômeno da floculação das leveduras	12
2.5.1 – Regulação genética	15
2.6 – Sistema de caracterização de leveduras	16
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 – Materiais	18
3.1.1 – Microrganismos	18
3.1.2 – Meio utilizado para obtenção do inóculo	18
3.1.3 – Inóculo	19
3.1.4 – Meio utilizado na fermentação	19
3.1.5 – Equipamentos	19
3.1.6 – Condução dos ensaios	20
3.2 – Métodos analíticos	21
3.2.1 – Determinação de sólidos solúveis	21
3.2.2 – Determinação de ART	21
3.2.3 – Determinação de etanol produzido	21
3.2.4 – Determinação de vazão real	22
3.2.5 – Cariotipagem	22
3.2.6 – Determinação de floculação por absorbância	23
3.2.7 – Identificação dos genes responsáveis pela floculação e avaliação do nível de expressão	24

<i>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	<i>25</i>
4.1 – Cepas selecionadas	25
4.2 – Comportamento operacional dos reatores	27
4.3 – Dinâmica de acúmulo de massa nos reatores 1 e 2	30
4.4 – Avaliação do desempenho do sistema de fermentação	36
4.5 – Teste de floculação	43
4.5.1 – Determinação de floculação por absorbância	43
4.5.2 – Identificação dos genes responsáveis pela floculação e avaliação do nível de expressão	44
4.6 – Comparativo entre as diferentes linhagens estudadas	45
4.6.1 – Altura do leito celular formado nos reatores	45
4.6.2 – Taxa de conversão	49
4.6.3 – Rendimento	55
4.6.4 – Produção de etanol	59
 <i>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES</i>	 <i>62</i>
 <i>CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	 <i>64</i>

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo a realização de um estudo aprofundado do processo de fermentação alcoólica contínua em que são utilizados reatores tubulares tipo torre e células auto-imobilizadas. Buscou-se nesse projeto a seleção entre quatro cepas com características floculantes e perfis metabólicos adequados ao trabalho em tais reatores. O anseio por melhorias no sistema de fermentação contínua com células auto-imobilizadas se dá em função da busca por métodos com reduzido custo de produção do etanol, o que ocorre nesse sistema, onde inexistente a necessidade da utilização de unidades de separação de células (centrifugas), reduzindo assim em torno de 15% o custo final do preço do produto acabado. As linhagens utilizadas foram quatro cepas do gênero *Saccharomyces cerevisiae* com características floculantes e formadoras de partículas esféricas (pellets) quando cultivadas em mesa agitadora circulatória. Duas dessas cepas selecionadas foram obtidas da unidade de fermentação industrial da Usina Junqueira (Igarapava/SP), isoladas durante a safra de janeiro de 2000, são elas as cepas JU C2 e JU C4, outras duas cepas foram obtidas através de recentes isolamentos no Departamento de Biotecnologia e Processos do CPQBA/Unicamp, cepas G1 e G2. No processo de otimização foram utilizados dois reatores tubulares em série, um primeiro reator (R1) recebia um substrato concentrado de sacarose, diluído em linha visando atingir concentrações pré-determinadas para o uso nos experimentos e um segundo reator (R2) que recebia o efluente (vinho fermentado) proveniente de R1.

Foram realizados quatro experimentos, cada qual com uma linhagem diferente. Os experimentos tiveram entre 20 a 25 dias de duração cada, porém, para fins de padronização foram selecionados 12 dias de ensaios. Durante os experimentos, diferentes vazões de alimentação aos reatores foram testadas, estas alternaram de forma crescente entre 1,2; 1,5; 1,8 e 2,1 L/h de substrato. Amostras foram retiradas do sistema e analisadas quanto à quantidade de sólidos solúveis, quantidade de ART, etanol produzido e vazão real do sistema. Ao término de cada experimento foram realizadas análises de cariotipagem, potencial de floculação por absorbância e determinação da floculação pela expressão dos genes FLO5 e FLO10. De forma geral, todas as linhagens estudadas mostraram-se hábeis ao trabalho em biorreatores fluidizados, desde que sejam respeitados seus limites metabólicos atuando nesse tipo de reatores. As linhagens JU C4 e G1 sobressaíram-se entre as demais pelo comportamento flexível e adaptável diante das situações impostas ao longo do projeto. Foram capazes de formar leitos celulares estáveis e com bom desempenho na conversão de açúcares á etanol. As linhagens JU C2 e G2 apresentaram também bons resultados na produção de etanol, no entanto, seus perfis como linhagens floculantes exigem uma maior cautela na utilização das mesmas em processos fermentativos. JU C2 com baixo poder floculante, formando por vezes leitos pouco estáveis e G2 com grande poder floculante, formando por vezes leitos compactos com canais preferenciais de passagem de substrato.

Palavras-chave: fermentação alcoólica contínua, reatores tipo torre, leveduras floculantes, células auto-imobilizáveis.

ABSTRACT

The major objective of this project is to study the continuous fermentation process using flocculation yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* in fixed bed tower reactors for ethanol production. We sought, through this job, the selection between four flocculent yeasts strains with appropriate metabolic profile to work in this kind of reactor. The selected yeasts strains present strong flocculent characteristics and there is no need to use cell separation unity (centrifuge) after the fermentation process reducing around 15% the costs of ethanol production. Two of these strains, JU C2 and JU C4, were collected from an industrial fermentation unity at Usina Junqueira (Igarapava/SP) during the crop of 2000. The other two strains, G1 and G2, were collected from CPQBA/Unicamp. In the operational optimization were used two fixed bed type tower reactors connected in series, a first one (R1) receive a concentrated sucrose medium diluted in line for reach predetermined concentrations and a second one (R2), that receive fermented wine from the first (R1). The fermentations experiments had between 20 or 25 days, but for standardization of the work 12 days of assays were selected. During the experiments, different feed outflow were tested in the reactors, these had been alternated in a increasing way between 1,2; 1,5; 1,8 and 2,1 L/h of medium. Samples were collected from the system and analyzed the amount of soluble solids, amount of reducing sugars, ethanol and real outflow of the system. In the ending of each experiment were analyzed the karyotyping profile and flocculating potential by absorbance method and expression of the *FLO1* and *FLO10* genes. The results confirm that all the studied strains are able to work in fluidized bioreactors since their metabolic limits where respected. The best results were obtained with JU C4 and G1 strains. They show a flexible and adaptable behavior ahead the tested situations in this job. They were capable to form steady beds and demonstrate good performance in sugar conversion to ethanol. The other strains, JU C2 and G2, showed nice results in the production of ethanol, however their flocculent profiles demand caution when used in fermentation processes. JU C2 has a low flocculent power forming sometimes unstable cell beds and G2 has a high flocculent power forming sometimes compact cell beds with preferential channels of medium passage.

Keys words: continuous alcoholic fermentation, tower reactors, flocculation yeast, self-immobilized yeast cell.

Capítulo 1

1 Introdução

A utilização de leveduras floculantes em biorreatores fluidizados tipo torre, com a conseqüente eliminação do reciclo de células apresentam duas vantagens básicas: a diminuição do custo de produção e a eliminação da reciclagem de materiais tóxicos ao metabolismo do microrganismo empregado neste seguimento, que estão presentes no efluente que retorna ao processo junto com as células centrifugadas e/ou decantadas.

Segundo VIEGAS (2003), basicamente o processo de fermentação contínua é constituído de tanques agitados ligados em série. Possui unidades separadoras que permitem o reciclo de células de leveduras, mantendo a concentração destas elevadas no processo, o que proporciona a obtenção de altas produtividades. Estas unidades separadoras, constituídas de máquinas centrífugas, são responsáveis por aproximadamente 20% dos custos industriais da produção de etanol. Portanto, processos que permitam a operação com alta concentração celular não necessitando destes equipamentos admitiriam uma redução significativa nos custos de produção do etanol e facilitando a automação do processo, já que a unidade de centrifugação é o único setor deste processo que não admite automação total, pois, ao se parar uma máquina a mesma tem que ser limpa antes de ser novamente colocada em funcionamento.

A utilização de reatores que permitam a retenção de células de levedura em seu interior elimina a necessidade da unidade de separação e permitem operar o processo com altas concentrações de células (45% v/v) e conseqüentemente altas produtividades (VIEGAS, 2003).

A grande dificuldade encontrada na implementação industrial deste processo é a formação de leitos celulares estáveis nos biorreatores, que permitam a condução do processo por longos períodos de tempo sem grandes variações nas condições operacionais. Um dos fatores primordiais ao qual está vinculado a

propriedade do leite se manter estável durante o processo fermentativo, está na característica genética e metabólica das cepas que operam esses sistemas.

Com base nesses dados e buscando evitar a necessidade de instalação de unidades de separação de células, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento operacional em biorreatores de tamanhos distintos e qualificar quanto ao desempenho fermentativo e poder de floculação quatro diferentes cepas de leveduras floculantes.

Capítulo 2

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Histórico

Segundo a UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo) o etanol é mundialmente reconhecido como combustível “ecologicamente correto”, devido a suas vantagens sócio-econômicas e ambientais frente a outros combustíveis fósseis comercializados. O Brasil por anos mostrou-se ao mercado internacional como o maior produtor do combustível no mundo, produzindo cerca de 16 bilhões de metros cúbicos de etanol total na safra 2005/06. (Portal UNICA)

A saga pelo desenvolvimento de energia alternativa começou nos anos 70 com a implantação do primeiro programa de produção em larga escala de combustível renovável, o Proálcool (Programa Nacional do Álcool). Três principais fatores foram determinantes na implementação desse programa no Brasil. O primeiro fator foi à brusca elevação no valor do barril de petróleo que saltou de U\$2,5 em 1973 para U\$20,00 em 1979 e alcançando a incrível marca de U\$34,40 em 1981 (ZANIN *et al.*, 2000).

O segundo fator foi que o programa capacitou o Brasil a uma dependência muito menor de energia importada na forma de óleo cru. Em 1973 o país importava cerca de 34% de petróleo, já após a implantação do Proálcool esse número caiu para 18% em 1986 (ZANIN *et al.*, 2000).

E o terceiro e mais importante fator foi a queda internacional no preço do açúcar, que passou de U\$1400 a tonelada métrica em novembro de 1974 para U\$268 em dezembro de 1975, levando os usineiros da época a busca por uma solução economicamente mais satisfatória junto ao governo federal (ZANIN *et al.*, 2000). Em dez anos foram investidos 16 bilhões de dólares em pesquisas genéticas para melhoria da cana-de-açúcar, subsídios ao preço do álcool e compra de novas máquinas agrícolas com financiamento a juros baixos (REVISTA

VEJA ed. 1941). Em 1985, com a queda no preço do petróleo no mercado internacional, o governo não conseguiu manter os subsídios. Em 1989, houve desabastecimento, e os brasileiros que tinham carros a álcool ficaram reticentes (GUANDALINI, G. & SILVA, C, 2006).

Atualmente a situação volta a ser favorável a produção do etanol, segundo FERREIRA (2002) estudos mostram que o setor tem correspondido positivamente aos estímulos externos, tanto os governamentais, agora escassos, como os provenientes do mercado de combustíveis. Esses estudos ainda relatam a disponibilidade de espaço para o aumento da produtividade da lavoura e da indústria que poderá fazer baixar ainda mais o custo.

Trinta anos depois do início do Proálcool, o Brasil vive agora uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer, em grande escala, o combustível alternativo. A nova escalada não é um movimento comandado pelo governo, como a ocorrida no final da década de 70, quando o Brasil encontrou no álcool a solução para enfrentar o aumento abrupto dos preços do petróleo que importava. A corrida para ampliar unidades e construir novas usinas é movida por decisões da iniciativa privada, convicta de que o álcool terá, a partir de agora, um papel cada vez mais importante como combustível, no Brasil e no mundo (GUANDALINI, G. & SILVA, C, 2006).

A tecnologia dos motores flex fuel veio dar novo fôlego ao consumo interno de álcool. Diante do nível elevado das cotações de petróleo no mercado internacional, a expectativa da indústria é que essa participação se amplie ainda mais. As vendas desses veículos já superaram as dos automóveis movidos a gasolina. Os bicombustíveis representaram 49,5% do total de automóveis e comerciais leves vendidos no mês (fevereiro/2006), enquanto a participação dos movidos a gasolina ficou em 43,3%, segundo a Anfavea – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. A preferência do mercado levou a Câmara Setorial de Açúcar e do Álcool, órgão ligado ao governo, a rever suas projeções e indicar que a participação da nova tecnologia deverá atingir 75% dos carros vendidos em 2006 (GUANDALINI, G. & SILVA, C, 2006).

2.2 Processos fermentativos

Basicamente existem três tipos de processos fermentativos para a obtenção de etanol, são eles: batelada simples (processo clássico), batelada alimentada (Melle-Boinot) e processo contínuo.

Segundo ALMEIDA (1960), surgiu na França na década de trinta o processo Melle-Boinot (batelada alimentada) que proporcionou um grande avanço na produção industrial de etanol.

Os processos de corte e clássicos (pé-de-cuba) eram muito utilizados até a década de sessenta no Brasil. Após essa época, os processos de batelada alimentada começaram a ser implantados (ANDRIETTA, 2004).

O processo contínuo surgiu como forma de aperfeiçoamento do processo Melle-Boinot apesar de não se tratar de um desenvolvimento recente (FINGUERUT *et al.*, 1992). Atualmente, de acordo com ZAPERLON & ANDRIETTA (1992), cerca de 40% das unidades industriais brasileiras utilizam processos de fermentação contínua.

Uma inovação para os processos fermentativos se deu pela utilização de leveduras floculantes, permitindo eliminar as separadoras centrífugas que têm por finalidade de separar as células do vinho fermentado (BU'LUCK, 1983).

2.2.1 Batelada

Trata-se de um processo de fermentação alcoólica descontínuo, que utiliza um inóculo novo a cada batelada. Segundo MAIORELLA *et al.* (1981), este processo é muito lento, pois se gasta muito tempo em etapas de limpeza e preparação do reator.

Para TOSETTO (2002), neste processo podem ser utilizados dois sistemas:

I) Sistema de cortes: no qual consiste realizar a primeira fermentação, logo em seguida o volume de vinho obtido é dividido em dois, parte enviada para a destilação e parte é utilizada como pé para a próxima fermentação;

II) Sistema de cultura pura ou pé-de-cuba: para cada fermentação, utiliza-se de uma cultura pura, logo em seguida é adicionado o mosto até completar o volume do reator.

2.2.2 Batelada Alimentada (Melle-Boinot)

Neste processo não se pode ultrapassar um valor limite de substrato, fazendo-se assim a alimentação do substrato ao mosto parceladamente, por pulsos ou de forma contínua. Neste caso há o reaproveitamento do inoculo utilizado, que é separado do vinho por centrifugação.

ALMEIDA (1960) descreve as seguintes vantagens do processo Melle-Boinot:

- Economia de açúcar devido a menor reprodução celular elevando o rendimento em etanol;
- Eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação das células de levedura);
- Fermentação mais pura devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido);
- Eliminação da necessidade de cultura para o preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo, portanto a complexidade das operações da planta.

2.2.3 Processo Contínuo

De uma forma geral, neste tipo de processo não há interrupções, ocorre a retirada contínua do produto a uma vazão igual à da alimentação, permitindo um fluxo contínuo, reduzindo assim, o efeito inibitório do etanol e do substrato.

Segundo RODRIGUES *et al.* (1992) este processo tem apresentado uma maior produtividade, com um aumento que pode atingir 100% em relação à batelada alimentada. Os processos contínuos apresentam as seguintes vantagens frente aos demais processos de produção de etanol:

- Aumentam a produtividade do processo, em virtude de uma redução dos tempos mortos ou não produtivos;
- Obtenção de caldo fermentado uniforme, o que facilita o projeto das operações de recuperação do produto de interesse (“downstream”);
- Manutenção das células em um mesmo estado fisiológico, o que torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou, ainda, para estudos de otimização da composição de meio de cultura;
- Possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção;
- Maior facilidade no emprego de controles avançados;
- Menor necessidade no emprego de mão-de-obra.
- Pode ser facilmente instalado em unidades produtoras de etanol convencionais.

CYSEWSKI & WILKE (1978), demonstraram uma redução de 57% no investimento de capital fixo em destilarias com fermentação contínua quando comparada ao daquelas que utilizam processo batelada. Reduções ainda maiores, da ordem de 68 e 71%, são obtidas para os processos que utilizam reciclo de células e operação a vácuo, respectivamente (ANDRIETTA, 2004).

Segundo ANDRIETTA (1994), o processo de fermentação contínua pode ser dividido em três etapas:

- Unidade de tratamento ácido
- Unidade de separação de células de levedura
- Fermentação propriamente dita

PAIVA *et al.*, (1996) demonstraram que é possível diminuir os custos de produção deste combustível operando com um reator de forma contínua, tipo torre, com altas concentrações de células utilizando decantadores como unidade de separação quando a cepa de levedura utilizada possui características

floculantes e ainda obter produtividade 14,4g de etanol/L. Em relação à batelada alimentada, esse processo tem apresentado uma maior produtividade, com aumento que pode atingir até 100% (RODRIGUES *et al.*, 1992).

ANDRIETTA (1992) acredita que a re-centrifugação do fermento e processos que não utilizam separadoras centrífugas são as duas alterações mais promissoras aos processos atuais de fermentação contínua.

2.2.3.1 Tipos de Reatores

Segundo ZAPERLON & ANDRIETTA (1992) vários processos para fermentação contínua tem sido utilizados, alguns dos quais sem êxito. Os principais processos podem ser divididos em dois grupos: (a) *Fermentação em dorna única*: onde todo o processo é realizado numa única dorna, de mistura completa, onde o teor de açúcares e etanol é constante e (b) *Fermentação em cascata*: onde as dornas individuais são conectadas em série, passando-se consecutivamente de uma para outra, assemelhando-se a uma “cascata”.

De acordo com GOMA *et al.* (1990), na fermentação alcoólica, a máxima produtividade foi alcançada fazendo uma combinação de reatores, sendo o primeiro reator de mistura perfeita, seguido de um reator tubular.

ANDRIETTA & STUPIELLO (1990) e ANDRIETTA (1991) provaram que a produtividade passa de 1,084 g/L.h para 10,092 g/L.h quando se utiliza um sistema constituído de quatro reatores de mistura perfeita com volumes diferenciados ligados em série ao invés de um único.

NAGASHIMA *et al.* (1984) propuseram dois tipos de arranjos para sistemas de fermentação alcoólica contínua. O primeiro foi a utilização de dois reatores torre de leito fluidizado em série e o segundo arranjo utilizou-se três reatores torre em série, todos com relação diâmetro/altura diferentes. A produtividade obtida foi 20 vezes maior que os processos tradicionais com uma conversão de 95% além da boa estabilidade operacional que foi obtida por um longo período de tempo.

VIEGAS *et al.*, (2002) trabalharam com dois reatores tipo torre ligados em série utilizando leveduras floculantes. Esse processo obteve produtividade máxima de 15,40 g de etanol/L.h mantendo um rendimento na faixa de 93%.

2.3 Biorreatores de Leito Fixo

Os reatores de leito fixo são equipamentos largamente utilizados na indústria química, principalmente em reações catalíticas. Atualmente, pesquisadores têm tido uma maior preocupação com a aplicação deste tipo de reator em processos biotecnológicos, onde o microrganismo atua como agente de transformação principalmente pela simplicidade no seu design e controle operacional.

Um reator de leito fixo consiste em um tubo cilíndrico preenchido de forma compacta por células de microrganismos e o reagente (substrato) escoar através do leito que é poroso. A Figura 2.1, apresenta esquematicamente um reator tubular de bancada e seus periféricos.

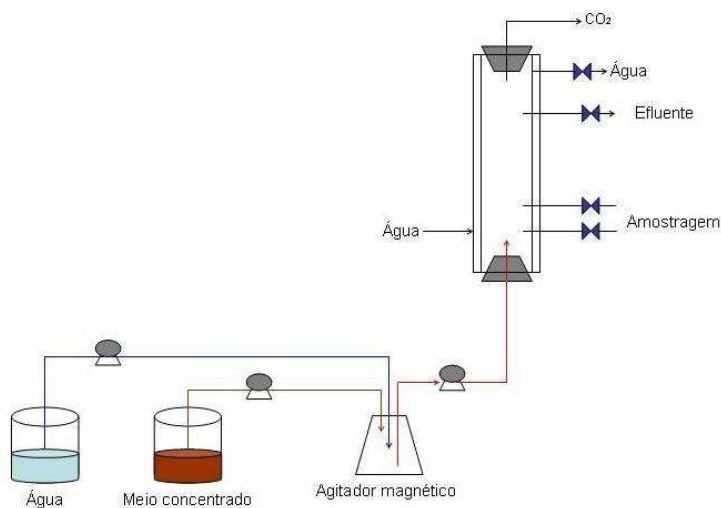


Figura 2.1 – Esquema da composição e funcionamento de um reator de bancada

LINKO *et al.* (1981) e NAGASHIMA *et al.* (1983), utilizaram levedura *Sacharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio como suporte para a produção de etanol. NAGASHIMA *et al.* (1983) obtiveram através da utilização de

uma planta piloto, uma produtividade de etanol 20 vezes mais alta que em um processo sem imobilização. A planta pôde ser operada mais de 4 meses sem esterilização.

Segundo ANDRIETTA (2004) as desvantagens relacionadas ao emprego desses biorreatores são principalmente à transferência de calor (baixa condutividade). Nestes reatores, a taxa de reação pode ser relativamente maior na entrada, devido a maior concentração de substrato, dependendo da taxa de liberação de energia ao longo da altura do reator pode não ser uniforme (TOLEDO, 1999).

BRAVO & GONZALEZ (1991) trabalharam com um reator encamisado tipo torre de leito fluidizado com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato, obtiveram uma concentração de etanol de 41 g/L num tempo de residência de 6.64 horas.

WIECZOREK & MICHALSKI (1994) estudaram um processo de fermentação contínua com células altamente floculantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Através dos dados obtidos de rendimento e produtividade, pode-se afirmar que os resultados são muito superiores aos obtidos quando usados métodos convencionais.

Segundo PRINCE & BARFORD (1982), a principal vantagem destes processos é a possibilidade de se trabalhar com altas concentrações celulares no interior do fermentador o que aumenta a produtividade do sistema fermentativo, além do fato de reduzir os custos de produção uma vez que tais processos não necessitam de unidades posteriores de separação de células.

HARSHBARGER *et al.* (1995) analisa o impacto econômico da utilização de um biorreator de leito fluidizado em uma planta de produção de etanol comparado a um processo convencional em batelada. Utilizando-se o biorreator de leito fluidizado operando continuamente com 30% de catalisador v/v e uma concentração de glicose na alimentação de 15% obtém-se um rendimento em etanol de 98% e uma conversão de substrato de 99,5%. No processo tradicional operando com um tempo de fermentação de 24 horas e uma concentração inicial de 15% de glicose obtém-se um rendimento em etanol de 95% e uma conversão

de 99,5%. O pesquisador conclui que o custo da planta industrial utilizando-se o biorreator de leito fluidizado é cerca de 17% mais barato comparado ao processo tradicional.

VIEGAS (1999) estudou um sistema de fermentação contínua operando com dois reatores tipo torre ligados em série, utilizando linhagens de levedura floculante isoladas de um processo industrial de produção de etanol. A seleção das linhagens de leveduras *Sacharomyces sp* floculantes foram realizadas em função da capacidade de floculação, que é responsável pela permanência destas no reator. Os valores de produtividade foram satisfatórios atingindo até 19,44 mL etanol/L.h (15,40 g etanol/L.h) com rendimentos elevados de 93%.

2.4 Bioquímica da Fermentação Alcoólica

As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas na produção de etanol e apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001).

Como entidade viva independente, a levedura realiza a fermentação dos açúcares com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. As células de levedura possuem compartimentos para adequação de sua atividade metabólica. A fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto que a oxidação total do açúcar (respiração), se dá na mitocôndria (AMORIM *et al*, 1996)

A primeira descrição das leveduras data de 1680 e foi realizada por Antonie van Leeuwenhoek, observando a cerveja em fermentação. Pasteur, em estudos divulgados a partir de 1866, provou que a fermentação é fruto da atividade de células vivas, as leveduras, na ausência de oxigênio (MILLER, 1983).

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e dióxido de carbono, envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. O rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Na prática, segundo OURA (1974), este valor não é observado devido à utilização de parte dos carboidratos açúcares fermentáveis para a produção de glicerol, álcoois superiores, ácidos, entre outras substâncias necessárias para a síntese de material celular e manutenção fisiológica da levedura. A Figura 2.2, mostra um fluxograma simplificado da conversão da glicose a etanol.

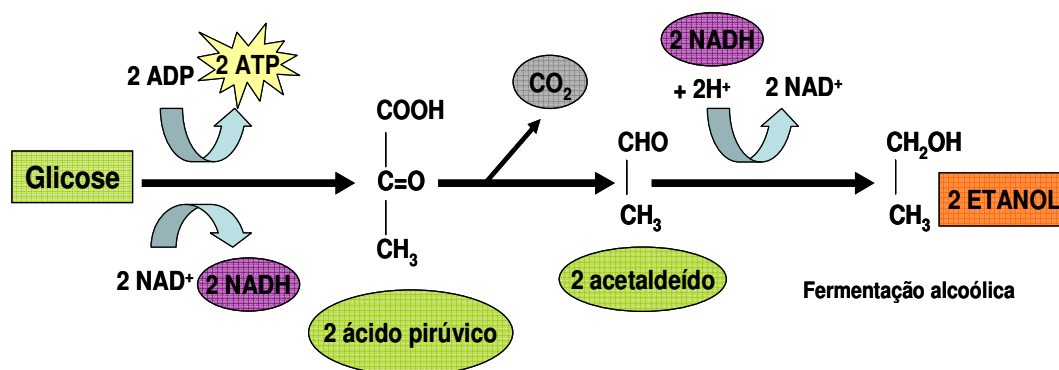


Figura 2.2 – Fluxograma simplificado da conversão de glicose a etanol.

De acordo com ANDRIETTA (2004), frente ao número elevado de reações catalisadas enzimaticamente no metabolismo celular, fatores como pH, temperatura, pressão, concentração de reagentes, concentração de nutrientes, etc., afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, consumo de substrato e produção de etanol.

As leveduras são hoje o mais importante grupo de microrganismos explorados comercialmente (RUSSEL *et al.*, 1987).

2.5 O Fenômeno de Floculação das Leveduras

A busca do entendimento do mecanismo da floculação em células de leveduras tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores. Segundo

JIN & SPEERS (1999) até a década de 60 muitos estudaram o efeito das condições do meio tais como: concentração de sais, açúcares, etanol, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e proteólises no mecanismo de floculação. Após a década de 70, estudos genéticos têm auxiliado na compreensão dos mecanismos que influenciam a floculação a nível molecular.

A floculação de cepas de levedura é um processo diretamente associado a proteínas “tipo” lectinas (lectin-like proteins), também conhecidas como floculinas, saem da parede celular das leveduras floculantes e atuam se ligando seletivamente a resíduos de manose (mananas) presentes na parede celular de outras cepas que compõem o meio. Para que a ligação ocorra, é imprescindível a presença de íons de cálcio livres para que haja a ativação das floculinas (BIDARD *et al.*, 1995; COSTA E MORADA-FERREIRA 2001; STRATFORD 1989, 1992).

ALCARDE (2001) explica que as lectinas (floculinas) são proteínas hábeis em ligar resíduos de açúcar. Segundo o mesmo autor, por um mecanismo similar, algumas proteínas da parede celular das leveduras podem se ligar a resíduos de açúcar das glicoproteínas da parede celular de outras leveduras. A Figura 2.3, adaptada do artigo de VERSTREPEN e colaboradores (2003), mostra a ligação floculina-manose em cepas de leveduras com características floculantes.

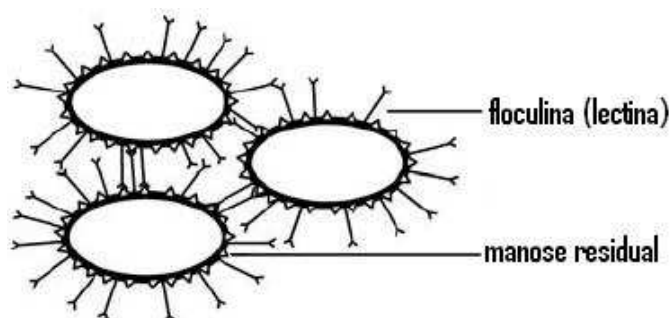


Figura 2.3 – Ligação floculina – manose em cepas de levedura floculantes, adaptada de VERSTREPEN *et al.* (2003).

Resíduos de manose podem estar presentes na parede celular tanto de cepas floculantes como não-floculantes, fortalecendo assim a hipótese de que o fator determinante para que ocorra a floculação é a presença de floculinas nestas cepas. (VERSTREPEN *et al.*, 2003).

Segundo VERSTREPEN e colaboradores (2003), a floculação é inibida pela presença de manose livre no meio fermentativo, provavelmente pela ocupação desta nos sítios de ligação livres das floculinas, impedindo assim estas de se ligarem a outras células. Ainda segundo o autor, para algumas cepas, a floculação é inibida não apenas pela manose, mas também pela glicose, frutose e maltose. O gene responsável pela inibição proveniente de outros açúcares é conhecido como *NewFlo*. Em adição aos conhecidos genes floculantes *Flo1* e *NewFlo*, outros genes também estão sendo estudados, sugerindo que algumas cepas de levedura podem flocular utilizando-se de diferentes mecanismos, como exemplo cepas que são insensíveis a inibição pela adição de manose ao meio (NISHIHARA *et al.*, 2002).

KAMADA & MURATA (1984) verificaram a intensificação na taxa de floculação de cepas de levedura *Saccharomyces* com o aumento da temperatura de 0°C para 30°C e que entre 50°C a 62°C ocorria uma drástica inibição do processo, porém, após retornar a uma temperatura inferior, a floculação era restabelecida. A mudança de pH segundo CALLEJA (1987) acarreta um efeito profundo na floculação, sendo que o pH ótimo é dependente da cepa do microrganismo. O efeito dos sais na floculação é dependente do tipo de cátion presente como manganês, magnésio e cálcio (SOUZA *et al.*, 1992). A Figura 2.4, adaptada do artigo de VERSTREPEN e colaboradores (2003), demonstrando fatores intrínsecos e extrínsecos à levedura que influenciam na floculação.

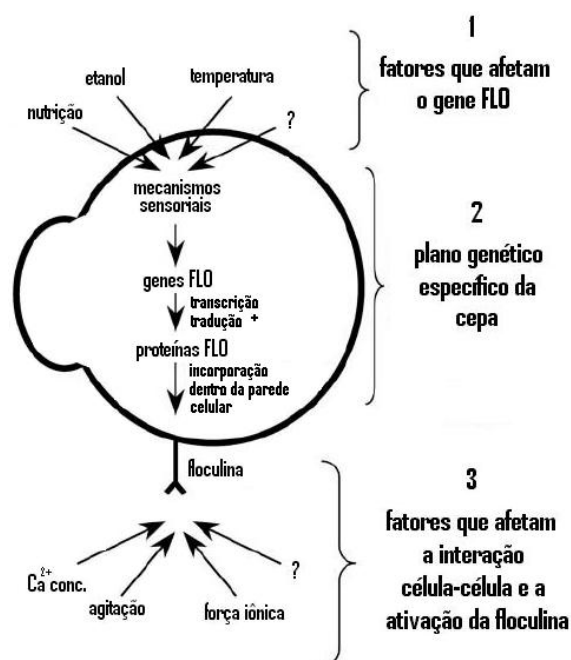


Figura 2.4 – Fatores que influenciam na floculação, adaptado de VERSTREPEN *et al.* (2003).

ALCARDE (2001) verificou a ocorrência da floculação de leveduras causada por algumas espécies de bactérias contaminantes no processo de produção de etanol.

Para indústrias produtoras de bebidas fermentadas como vinho e cerveja, o fenômeno de floculação das leveduras é benéfico ao processamento, sendo que esse fenômeno facilita a separação das células de levedura do líquido fermentado (SHINOHARA *et al.*, 1997).

2.5.1 Regulação Genética

Como outras proteínas, as floculinas são codificadas por genes específicos, os chamados genes *FLO*. Desta família o mais conhecido é o *FLO1*, um gene dominante situado no braço direito do cromossomo 1 (VERSTREPEN *et al.* 2003). A partir do momento que esses genes *FLO* são ativados, as floculinas são formadas e inicia-se então a floculação (STRATFORD, 1992).

Infelizmente, a situação para que ocorra a floculação é mais complexa. Em primeiro lugar, a família *FLO* é composta por uma gama de genes, cada qual com um mecanismo de regulação próprio, podendo ter sua ação induzida ou reprimida

por diferentes fatores (TEUNISSEN *et al.*, 1993). Em segundo lugar, a família *FLO* é também bastante instável, causando perfis de floculação diferentes entre cepas de espécies distintas, ou até mesmo entre gerações diferentes de uma mesma cepa (SATO *et al.* 2002; WATARI *et al.* 1999). Em terceiro lugar, a floculação não se trata apenas de um processo bioquímico, para que haja a mesma é necessário que forças físicas estejam interagindo no meio, para que ocorra a colisão entre células e assim a interação floculina-manose seja estabelecida (VERSTREPEN *et al.* 2003).

Fatores que promovam o aumento da hidrofobicidade ou diminuam a repulsão á cargas eletrostáticas negativas na parede celular das leveduras, são conhecidas como promotores de uma vigorosa floculação, presumivelmente por facilitar o contato célula-célula (STRATFORD 1992; STRAVER *et al.* 1993).

2.6 Sistema de caracterização de leveduras

Segundo ANDRIETTA (2004), as leveduras do gênero *Saccharomyces* têm sido domesticadas como resultado de milênios de exploração em ambientes industriais criados pelo homem. Ainda segundo o autor, análises genéticas têm demonstrado que a variedade na expressão fenotípica de características de desempenho freqüentemente observada em cepas deste gênero pode ser resultado da presença de genes de múltiplos loci que podem estar ativos, silenciosos ou perdidos em diferentes cepas de mesma espécie. Segundo CARDINALI & MARTINI (1994), este fato pode explicar a freqüente dificuldade na identificação de *S. cerevisiae* pela taxonomia convencional, que basea-se nas características morfológicas e fisiológicas expressas pelas leveduras.

Outras técnicas alternativas de identificação de leveduras baseadas em traços fenotípicos têm sido utilizadas como: sorologia (TSUCHIYA *et al.*, 1965), conteúdo de trealose (GUTIERREZ, 1990), composição de ácidos graxos (TREDoux *et al.*, 1987; BENDOVA *et al.*, 1991; STECKELBERG, 2001), eletroforese de proteínas extracelulares (BOUIX & LEVEAU, 1983) e intracelulares (VAN VUUREN & VAN DER MEER, 1988). Porém, segundo NESS *et al.* (1993),

estas técnicas estão baseadas em características que podem variar segundo diferentes estados fisiológicos das células.

Entre métodos que utilizam meios de cultivo diferenciais para distinguir cepas de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, o meio WLN é indicado por CAMPBELL (1999).

Atualmente, os métodos mais utilizados na identificação e caracterização de cepas de levedura envolvem análise de DNA. Segundo ANDRIETTA (2004), como as leveduras têm um grau de parentesco muito próximo, várias cepas apresentam grande homologia entre as moléculas de DNA e conteúdos de GC (guanina+citosina) idênticos. Assim, BOULTON *et al.* (1996) afirma que métodos baseados nesses parâmetros são de pouca utilidade na identificação de cepas.

De acordo com ANDRIETTA (2004) vários outros métodos moleculares têm sido desenvolvidos recentemente com o propósito de apresentar um único padrão de DNA para uma cepa ou espécie. Estes métodos recebem o nome genérico de DNA fingerprinting, sendo eles: PCR – Reação em cadeia polimerase, PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado, RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso e RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmento restrito.

Segundo DEGRÉ *et al.* (1989), CASEY *et al.* (1990), QUEROL *et al.* (1992) e MIANI *et al.* (1998), estudos comparativos de alguns métodos de caracterização de cepas de levedura demonstram que a análise eletroforética de cromossomos é capaz de diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Capítulo 3

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram quatro cepas de levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* com característica floculante

formadoras de partículas esféricas (pellets), quando cultivadas em mesa agitadora circulatória.

Duas dessas cepas, JU C4 1/00 (Destilaria Junqueira, cepa 4, coleta de janeiro/2000) e JU C2 1/00 (Destilaria Junqueira, cepa 2, coleta de janeiro/2000), foram selecionadas do projeto – FAPESP, nº. 01/02064-9 – “SELEÇÃO DE LEVEDURAS FLOCULANTES PARA USO EM REATORES (TIPO TORRE) FLUIDIZADOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL”, ANDRIETTA S. R., (2004), e outras duas obtidas de recentes isolamentos, G1 e G2.

3.1.2 Meio utilizado para obtenção do inóculo

O meio utilizado para a obtenção do inóculo foi preparado em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio estéril (15 min/121°C) na composição indicada conforme tabela 3.1.

Tabela 3.1 – composição do meio utilizado na obtenção do inóculo.

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	150
KH ₂ PO ₄	5,0
NH ₄ Cl	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
KCl	1,0
Extrato de levedura	6,0

3.1.3 Inóculo

O inóculo utilizado na partida dos biorreatores foi preparado da seguinte forma: erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio estéril (15 min/121°C), foram inoculados com suspensão de células de levedura desenvolvidas em tubos inclinados contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar). Os frascos foram incubados em mesa agitadora por 24 h a 32°C e 150 rpm. Em seguida, o material fermentado contendo as células já crescidas na forma de partículas esféricas (pelets) serviu de inóculo para o sistema de reatores.

3.1.4 Meio utilizado na fermentação

No experimento foi realizado diluição em linha através da utilização de garrações contendo água de processo, meio fermentativo concentrado e bombas peristálticas conforme indicado anteriormente na Figura 2.1. A tabela 3.2 mostra a composição do meio fermentativo utilizado.

Tabela 3.2 – Composição do meio de fermentação concentrado utilizado nos experimentos.

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	600,0
KH ₂ PO ₄	20,0
NH ₄ Cl	6,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,0
KCl	4,0
Extrato de levedura	24,0

3.1.5 Equipamentos

O aparato fermentativo utilizado é composto por dois reatores tipo torre de bancada, com dimensões e capacidades distintas. Um reator “inicial” (R1), que recebe alimentação proveniente da linha de diluição meio de fermentação/água, foi construído em acrílico, possui 11 centímetros de diâmetro, 70 centímetros de altura e capacidade para aproximadamente 5 litros. Este apresenta um sistema interno de controle de temperatura composto por tubos de vidro com água corrente que percorrem todo espaço do reator, conforme mostrado na figura 3.1. Um segundo reator (R2), que recebe alimentação proveniente do reator 1, foi construído em vidro, tem 5,8 centímetros de diâmetro, 78 centímetros de altura e capacidade de 1,4 litros. Este possui um sistema externo de controle de temperatura (encamisado), mantendo a mesma na faixa dos 32° C.

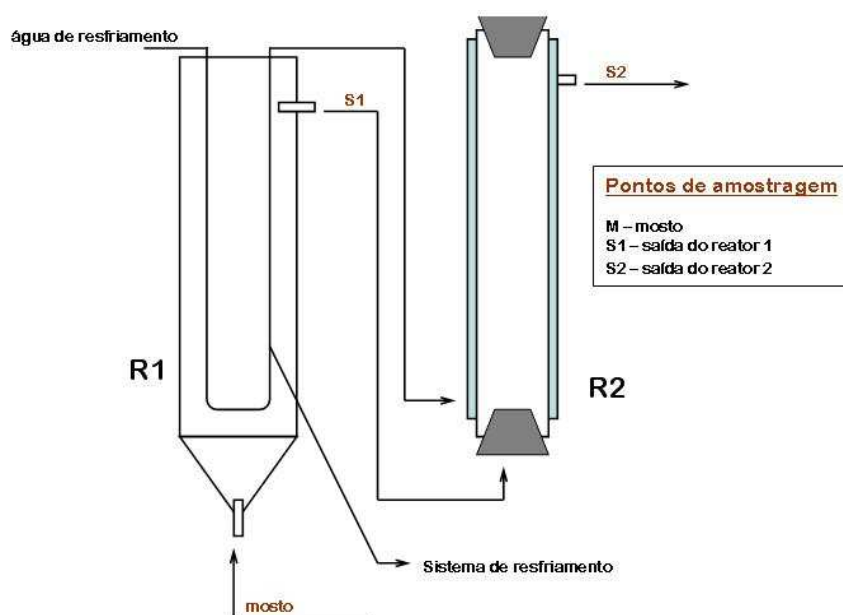


Figura 3.1 – Esquema dos reatores, com pontos de amostragem e sistema de resfriamento interno (R1) e externo (R2).

3.1.6 Condução dos ensaios

Oito frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100mL de inóculo, obtidos conforme indicado no item 3.1.3, foram adicionados ao reator 1. A vazão de alimentação foi ajustada inicialmente para cerca de 10 mL/min, visando assim o crescimento e a formação de leito de células no reator. Após formação de cerca de 10 a 12 cm de leito celular no reator 1, deu-se início a etapa de coleta de dados de cada experimento, que teve como duração de 20 a 25 dias, onde valores de vazões de 1,2; 1,5; 1,8 e 2,1 L/h de meio fermentativo na alimentação dos reatores foram estudados. O valor do ART de alimentação sofreu variações no decorrer dos experimentos, operando com concentrações mais baixas no início do processo e mais altas no final, mantendo-se em média na faixa de 167,3g/L.

Nesta etapa, foram retiradas diariamente cerca de 20mL de amostra de três pontos distintos do sistema, conforme indicado na figura 3.2. As amostras provenientes dos reatores foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm, todas foram armazenadas em freezer a -18°C . Foram realizadas análises de ART nas três amostras e análises de etanol nas amostras das saídas dos reatores 1 e 2, como mostrado na Figura 3.2.

Aferições diárias da altura do leito formado nos reatores foram efetuadas para acompanhamento do nível de crescimento e compactação de cada uma das cepas analisadas.

Foi ainda determinada diariamente a vazão real de alimentação, e ao termino de cada experimento, amostras dos reatores foram coletadas para análises de crescimento em meio diferencial WLN e cariotipagem.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Determinação de sólidos solúveis

A determinação de sólidos solúveis (%) no meio de fermentação foi realizada em refratômetro ótico (Marca: American Optical ABBE Refractometer).

3.2.2 Determinação de ART

A quantificação dos açúcares redutores totais presentes no mosto e efluente dos reatores 1 e 2, foi determinada pelo método DNS (MULLER, 1959). Neste procedimento, o primeiro passo realizado foi a realização de uma hidrólise ácida (realizada com HCl 0,1N) da sacarose á açúcares redutores que podem então ser analisados e quantificados pelo método. Este método baseia-se numa reação colorimétrica, onde a concentração dos açúcares redutores após a reação com o DNS (ácido dinitrosalicílico) é proporcional a absorbância no espectro visível a $\lambda = 540 \text{ nm}$.

3.2.3 Determinação de Etanol produzido

As amostras utilizadas neste experimento foram previamente destiladas. Foi utilizado método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. O método descrito por SALIK & POVH (1993), se baseia na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro.

A qualificação do etanol é feita através da comparação com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de etanol.

3.2.4 Determinação da vazão real

A vazão real foi determinada pela aferição do volume de saída de efluente do reator 2, coletados em uma proveta de 1 litro, durante uma hora de ensaio.

3.2.5 Cariotipagem

A fim de confirmar a pureza no leito dos biorreatores, foram realizadas análises de cariotipagem por meio de eletroforese de campo pulsado. Amostras provenientes do reator foram plaqueadas utilizando-se o método de espalhamento em superfície e incubadas por 7 dias em estufa a 32 °C. Após este procedimento, as colônias com diferenças morfológicas foram purificadas em placas de PDA utilizando técnica de estrias.

As cepas purificadas em meio PDA foram utilizadas para confecção de plugs utilizados na cariotipagem. Os plugs foram confeccionados em moldes de acrílico, onde serão adicionados em cada poço 40 µL de solução de lise (0,020 g de enzima de lise em 3 mL de CPES), um alçada das colônias crescidas nas placas de PDA e 40 µL de agarose low melt (1,5% dissolvido em CPE). Esta mistura foi homogeneizada e mantida em geladeira por 30 minutos. Em seguida os plugs foram removidos dos moldes e mantidos em tubos tipo eppendorf imersos em solução CPE por 4 horas a temperatura ambiente. Logo após, é retirada a solução de CPE dos eppendorfs e adicionada solução de proteinase K em quantidade suficiente para cobrir os plugs. Estes tubos foram então mantidos em banho a 50 °C por 16 horas. Passado este tempo, a solução de proteinase foi retirada e é adicionada solução de EDTA, sendo estes então conservados em geladeira até o momento de utilização. Os plugs foram aparados e colocados nos poços existentes no gel de agarose a 1,0%. Estes foram cobertos com gel de agarose fundido. A placa de gel contendo os plugs foi inserida em uma cuba de

eletroforese contendo 2,2 litros de solução tampão TBE 0,5x a uma temperatura de 13,5 °C. A corrida foi realizada nas seguintes condições:

- ângulo 120°
- gradiente de voltagem 6 V/m
- temperatura 13,5 °C
- tampão TBE 0,5x
- tempo de pulso: 5 segundos por horas; 60 segundos por 8 horas e 100 segundos por 12 horas.

Após o término da corrida, o gel foi retirado da cuba, lavado e corado com solução reveladora de brometo de etídio por 30 minutos, logo em seguida fotografado sob luz UV. As imagens foram analisadas através do programa UVP BioImage System.

3.2.6 Determinação de floculação por absorbância

Visando determinar o potencial de floculação de cada cepa analisada, foram realizados testes seguindo método descrito por BENDIAK *et al.* (1996). Este método consiste em um tratamento duplo (A e B) de tubos previamente centrifugados contendo a cepa a ser analisada. Nos tubos A, a cepa centrifugada recebe um tratamento com EDTA 0.5M, e num tubo B, recebe tratamento de soluções contendo cálcio em sua composição. Ao término do experimento, são lidas as absorbâncias obtidas em espectrofotômetro a 600 nm. O resultado obtido é aplicado a equação:

$$\frac{(A - B) * 100}{A} \quad \text{onde:} \quad \begin{array}{l} A = \text{absorbância no tubo A} \\ B = \text{absorbância no tubo B} \end{array}$$

Os resultados são expressos em porcentagem de floculação. Valores abaixo de 20% são classificados como cepas não floculantes, valores entre 20 e 80% são consideradas medianamente floculantes e acima de 85% como muito floculantes.

3.2.7 Identificação dos genes responsáveis pela floculação e avaliação do nível de expressão

Visando a identificação de genes responsáveis pelo processo da floculação entre células de *Saccharomyces cerevisiae* bem como a avaliação do nível de expressão dos mesmos, foram realizados experimentos* de acordo com a metodologia indicada abaixo:

As leveduras foram crescidas em meio YEPD durante 16 horas a 30°C sob agitação de 200rpm. O RNA total foi extraído pelo método do fenol ácido quente e o *Northern blotting* foi feito segundo protocolos básicos (AUSUBEL *et al.*, 1998).

O fragmento da sonda (DNA) referente aos genes *FLO1* e *FLO10* foram marcados radioativamente usando $\alpha^{[32]}\text{P}$ -dATP (AUSUBEL *et al.*, 1998). Dessa forma foi possível verificar por análise de *Northern* qual o gene responsável pela manifestação do fenótipo floculante e qual seu nível de expressão em cada uma das quatro linhagens estudadas.

* Os experimentos foram realizados pela doutoranda
Sílvia Kazue Missawa no Laboratório de Genômica e
Expressão (LGE) da Unicamp

Capítulo 4

4 Resultados e Discussões

4.1 – Cepas Seleccionadas

Os critérios adotados para o presente trabalho na seleção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas foram:

- Possuir característica floculante.
- Ser formadora de partículas esféricas (pellets) quando crescidas em mesa agitadora com movimento circular.
- Possuir um bom desempenho fermentativo.

Com base nesses parâmetros, foram seleccionadas 4 cepas para os experimentos, duas dessas cepas, JU C4 1/00 (Destilaria Junqueira, cepa 4, coleta de janeiro/2000) e JU C2 1/00 (Destilaria Junqueira, cepa 2, coleta de janeiro/2000), foram seleccionadas do projeto – FAPESP, nº. 01/02064-9 – “SELEÇÃO DE LEVEDURAS FLOCULANTES PARA USO EM REATORES (TIPO TORRE) FLUIDIZADOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL”, ANDRIETTA S. R., (2004), e outras duas obtidas em isolamentos recentes, G1 e G2.

Os experimentos foram realizados adotando a seguinte ordem:

- 1º Experimento – cepa JU C4 1/00.
- 2º Experimento – cepa G1.
- 3º Experimento – cepa JU C2 1/00.
- 4º Experimento – cepa G2.

As Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4 mostram aspectos das colônias das 4 cepas estudadas após 7 dias de incubação crescidas em meio WLN, tipo da partícula formada por estas quando crescidas em meio sintético em mesa agitadora de movimento circular e perfil cromossômico destes.



Figura 4.1 – Cella JU C4 1/00, colônia após 7 dias de incubação em meio WLN, tipo de partícula esférica formada e perfil cromossômico



Figura 4.2 – Cella G1, colônia após 7 dias de incubação em meio WLN, tipo de partícula esférica formada e perfil cromossômico

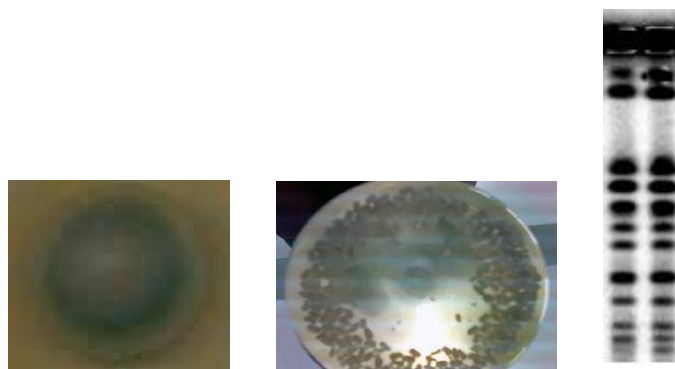


Figura 4.3 – Cella JU C2 1/00, colônia após 7 dias de incubação em meio WLN, tipo de partícula esférica formada e perfil cromossômico

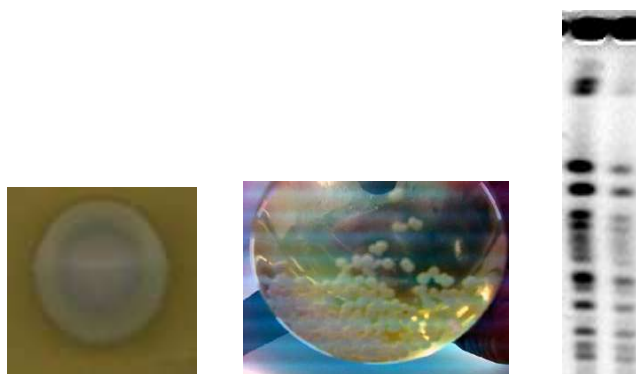


Figura 4.4 – Cepa G2, colônia após 7 dias de incubação em meio WLN, tipo de partícula esférica formada e perfil cromossômico

Observa-se pelas figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4 que as 4 cepas analisadas apresentam perfil cromossômico diferentes entre si, afirmando assim a real existência e utilização neste trabalho de linhagens distintas. As colônias obtidas também apresentam certas diferenças entre si como coloração e forma do centro, podendo assim ser distinguidas, porém com uma menor precisão em relação ao perfil cromossômico. As partículas esféricas obtidas com o crescimento em mesa agitadora circular também possuem algumas distinções entre si, mas fatores externos (número de rotações por minuto, tipo de erlenmeyer utilizado, etc) a este crescimento afetam diretamente a forma das partículas obtidas, não se tratando, portanto, de um bom método na distinção entre as linhagens estudadas.

4.2 Comportamento operacional dos reatores

A Tabela 4.1 mostra as condições de operação do sistema de fermentação do primeiro experimento realizado (cepa JU C4 1/00) para cada dia de ensaio.

Tabela 4.1 – Dados de operação do sistema fermentativo no primeiro experimento realizado para cada dia de ensaio

Dia de ensaio	Sólidos solúveis na alimentação (% p/p)	Açúcares redutores totais na alimentação (g/L)	Vazão teórica (L/h)	Vazão real (L/h)	Volume do sistema (L)	Tempo de residência (h)
1	17,3	153	1,2	1,19	6,4	5,36
2	17,2	152	1,2	1,19	6,4	5,36
3	17	149,8	1,2	1,28	6,4	5,01
4	17,8	161,9	1,5	1,47	6,4	4,35
5	18	165,2	1,5	1,46	6,4	4,37
6	18,3	167,5	1,5	1,49	6,4	4,30
7	18,7	171,9	1,8	1,76	6,4	3,64
8	18,6	169,7	1,8	1,75	6,4	3,65
9	18,4	167,3	1,8	1,75	6,4	3,65
10	18,6	170,1	2,1	2,10	6,4	3,05
11	18,5	168,7	2,1	2,05	6,4	3,12
12	17,8	163,1	2,1	2,08	6,4	3,08

A Tabela 4.2 mostra as condições de operação do sistema de fermentação do segundo experimento realizado (cepa G1) para cada dia de ensaio.

Tabela 4.2 – Dados de operação do sistema fermentativo no segundo experimento realizado para cada dia de ensaio

Dia de ensaio	Sólidos solúveis na alimentação (% p/p)	Açúcares redutores totais na alimentação (g/L)	Vazão teórica (L/h)	Vazão real (L/h)	Volume do sistema (L)	Tempo de residência (h)
1	16,3	153,8	1,2	1,29	6,4	4,96
2	17,4	163,4	1,2	1,12	6,4	5,73
3	16,7	160,8	1,2	1,22	6,4	5,25
4	18,2	180,9	1,5	1,51	6,4	4,23
5	18,1	178,8	1,5	1,45	6,4	4,43
6	18,1	178,8	1,5	1,44	6,4	4,44
7	18	179,8	1,8	1,74	6,4	3,68
8	18	178,8	1,8	1,76	6,4	3,64
9	18,3	161,9	1,8	1,76	6,4	3,64
10	19,2	167,9	2,1	1,89	6,4	3,39

11	19,5	171	2,1	2,04	6,4	3,14
12	19,9	175	2,1	2,05	6,4	3,12

A tabela 4.3 mostra as condições de operação do sistema de fermentação do terceiro experimento realizado (cepa JU C2 1/00) para cada dia de ensaio.

Tabela 4.3 – Dados de operação do sistema fermentativo no terceiro experimento realizado para cada dia de ensaio

Dia de ensaio	Sólidos solúveis na alimentação (% p/p)	Açúcares redutores totais na alimentação (g/L)	Vazão teórica (L/h)	Vazão real (L/h)	Volume do sistema (L)	Tempo de residência (h)
1	15,9	159,3	1,2	1,32	6,4	4,85
2	16,5	162,4	1,2	1,20	6,4	5,33
3	17,9	178,3	1,2	1,26	6,4	5,08
4	18,1	185,7	1,5	1,48	6,4	4,34
5	17,4	176,2	1,5	1,52	6,4	4,22
6	16,8	165,3	1,5	1,60	6,4	4,01
7	16,7	167,6	1,8	1,72	6,4	3,73
8	16,7	165,3	1,8	1,76	6,4	3,64
9	16,7	166,5	1,8	1,76	6,4	3,64
10	16,2	158,3	2,1	2,08	6,4	3,08
11	16,8	159,5	2,1	1,96	6,4	3,26
12	17,2	165,3	2,1	2,08	6,4	3,08

A Tabela 4.4 mostra as condições de operação do sistema de fermentação do quarto experimento realizado (cepa G2) para cada dia de ensaio.

Tabela 4.4 – Dados de operação do sistema fermentativo no quarto experimento realizado para cada dia de ensaio

Dia de ensaio	Sólidos solúveis na alimentação (% p/p)	Açúcares redutores totais na alimentação (g/L)	Vazão teórica (L/h)	Vazão real (L/h)	Volume do sistema (L)	Tempo de residência (h)
1	15,1	157,9	1,2	1,23	6,4	5,21
2	14,7	160	1,2	1,32	6,4	4,85
3	13,6	147,3	1,2	1,32	6,4	4,85
4	16,2	167,4	1,5	1,58	6,4	4,06
5	17	185,4	1,5	1,52	6,4	4,21
6	17,4	168,5	1,5	1,58	6,4	4,05
7	17	187,3	1,8	1,96	6,4	3,27
8	16,7	179,2	1,8	1,78	6,4	3,60

9	16,7	182,6	1,8	1,67	6,4	3,84
10	16,7	175,7	2,1	2,12	6,4	3,01
11	15,9	179,2	2,1	2,08	6,4	3,08
12	15,7	175,7	2,1	2,00	6,4	3,19

Observa-se pelas quatro tabelas apresentadas que os experimentos sofreram pequenas variações quanto à quantidade de açúcares redutores totais na alimentação e consequentemente sólidos solúveis. Nos quatro experimentos foram adotados acréscimos nas vazões de alimentação (1,2 – 1,5 – 1,8 e 2,1 L/h do meio) no intuito de avaliar a capacidade fermentativa e comportamento metabólico das linhagens estudadas em condições diferenciadas de alimentação. O tempo total de cada ensaio foi igual ou superior a 20 dias. Os ensaios foram divididos em 4 partes, cada uma composta por 3 dias, nos quais foram coletados os dados referentes a cada vazão estudada, totalizando assim 12 dias de ensaio.

4.3 – Dinâmica de acúmulo de massa celular nos reatores 1 e 2

A dinâmica de acúmulo de massa celular no reator foi acompanhada pelo aumento da altura do leito formado em cada reator. A figura 4.5 mostra graficamente o aumento da altura dos leitos no reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação no primeiro experimento e a Figura 4.6 foto dos reatores tipo torre e floculação formada em cada um deles no primeiro experimento.

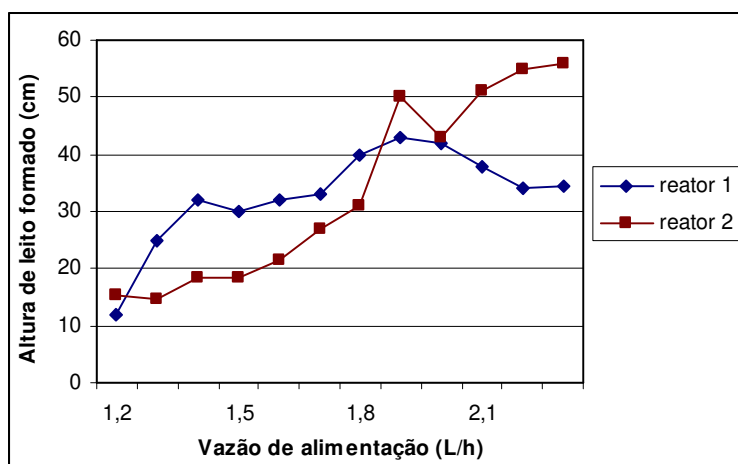


Figura 4.5 – Variação da altura do leito de células do reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação utilizadas no primeiro experimento.

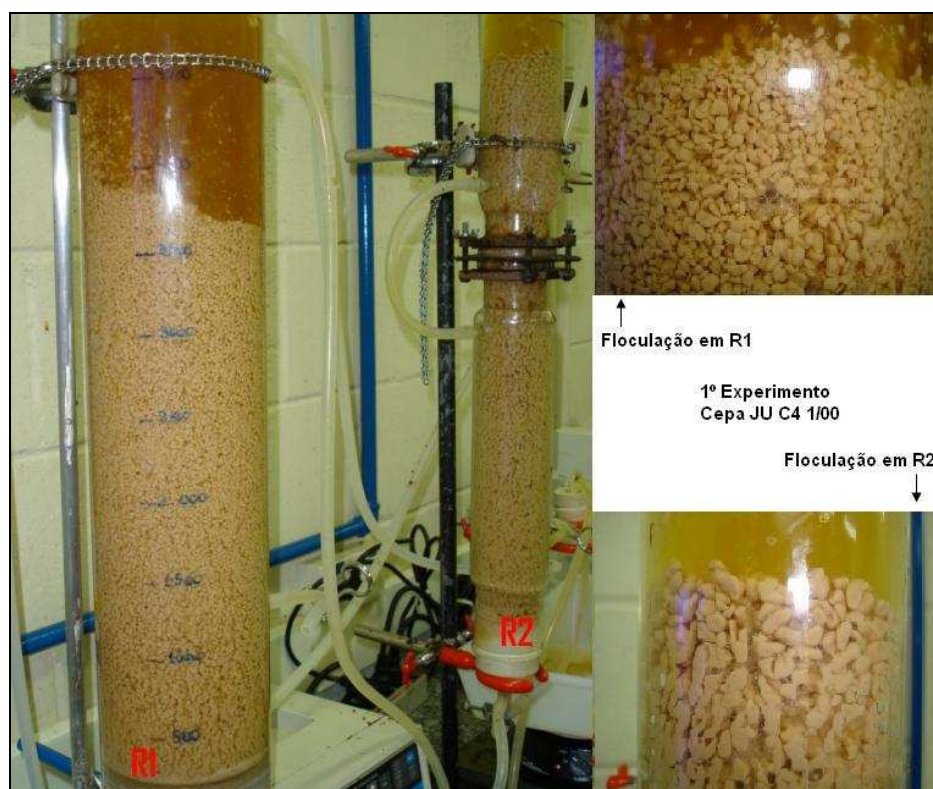


Figura 4.6 – Foto dos reatores tipo torre 1 e 2 e floculação formada em cada um deles no primeiro experimento

Observa-se pela Figura 4.5 que o leito de células gerado no reator 1 teve um crescimento superior ao do reator 2 durante aproximadamente metade do tempo do experimento em função da maior concentração de açúcares contida no interior do reator. A partir do sétimo dia (vazão 1,8L/h), o reator 1 atingiu seu ponto máximo de crescimento e começou então a ceder em maior grau células para o reator 2 por meio da forte liberação de dióxido de carbono ocorrida neste reator devido a alta velocidade de fermentação que se intensificou com o aumento da vazão. Nesta etapa pode ser observado um crescimento acentuado no segundo reator seguido de decréscimo e manutenção na altura do primeiro. Nota-se então que ambos os reatores atingiram seu ponto de estado estacionário com o início da adoção da vazão de 2,1L/h de mosto.

A Figura 4.7 mostra graficamente o aumento da altura dos leitos no reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação no segundo experimento e a Figura 4.8,

foto dos reatores tipo torre e floculação formada em cada um deles no segundo experimento.

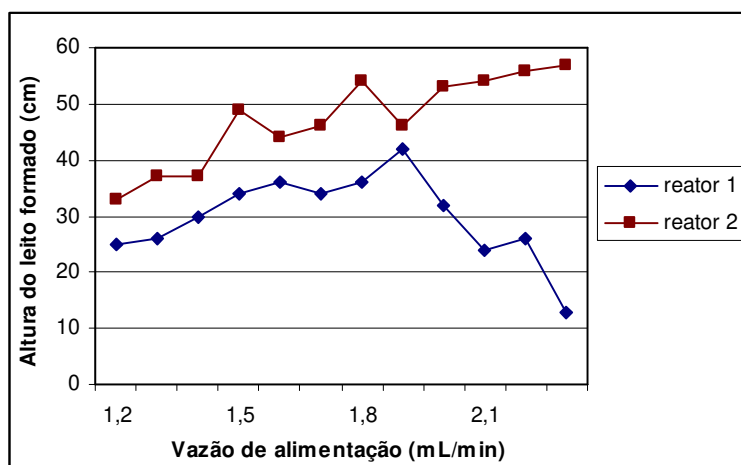


Figura 4.7 – Variação da altura do leito de células do reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação adotadas no segundo experimento.

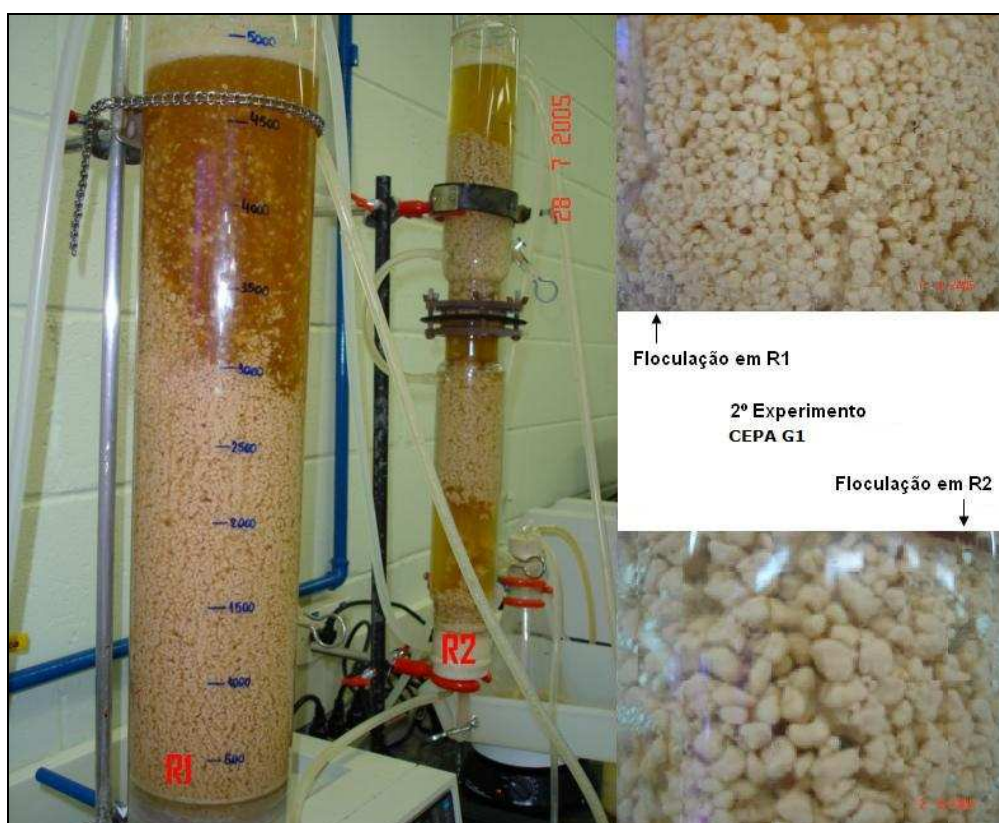


Figura 4.8 – Foto dos reatores tipo torre 1 e 2 e floculação formada em cada um deles no segundo experimento

Observa-se pela figura 4.7 que a cepa G1 não apresentou boa estabilidade no reator 1. O aumento do número de células neste primeiro reator foi susceptível ao acréscimo da vazão, não suportando vazões maiores que 1,8L/h. No decorrer de todo experimento o forte desprendimento de dióxido de carbono no reator 1 alimentou com grande intensidade o reator 2 com células. O mesmo pode ser verificado pelos dados contidos na Figura 8, onde o leito formado no reator 2 foi superior em altura durante todos os dias de ensaios realizados. Pode-se afirmar ainda observando esta figura que não foi possível a obtenção de um estado estacionário no reator 1. O mesmo não foi observado no reator 2, já que por volta do décimo primeiro dia de ensaio observou-se certa manutenção na altura deste. A realização deste experimento com vazões de alimentação igual ou inferiores a 1,8 L/h poderia levar a obtenção de um estado estacionário em ambos os reatores.

A Figura 4.9 mostra graficamente o aumento da altura dos leitos no reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação adotadas no terceiro experimento e a Figura 4.10 foto dos reatores tipo torre e floculação formada em cada um deles no terceiro experimento.

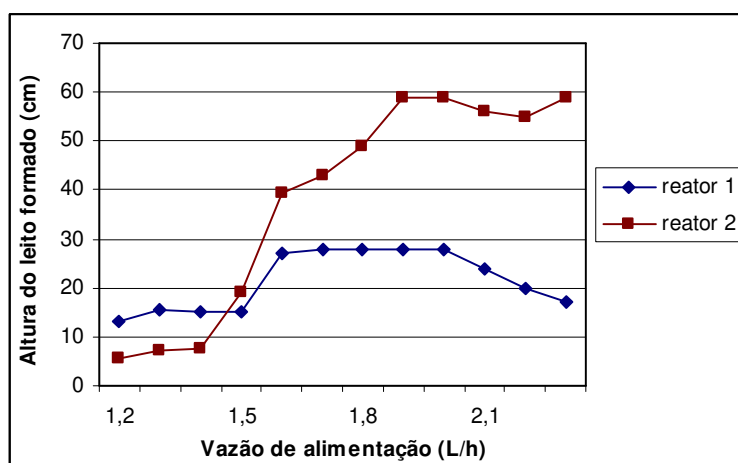


Figura 4.9 – Variação da altura do leito de células do reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação adotadas no terceiro experimento.

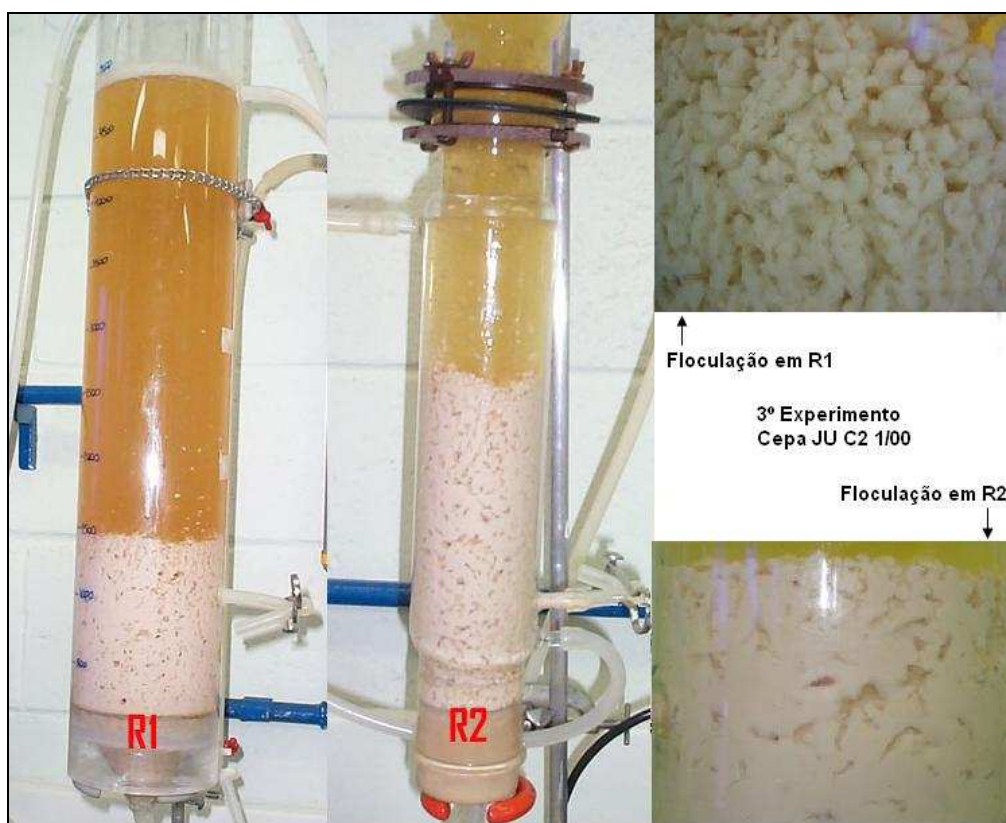


Figura 4.10 – Foto dos reatores tipo torre 1 e 2 e floculação formada em cada um deles no terceiro experimento.

Observa-se pela figura 4.9 que a cepa JU C2 1/00 utilizada no terceiro experimento demonstrou um comportamento semelhante ao da cepa do experimento anterior. O reator 1 atingiu estado estacionário entre o quinto e o nono dia de ensaio (vazões 1,5 e 1,8L/h), mas foi susceptível ao aumento na vazão de alimentação, levando a desestabilização do leito formado e dessa forma cedendo grande parte de suas células para o reator 2. Este reator por sua vez não foi capaz de atingir um ponto de estado estacionário em nenhum momento do ensaio realizado. Neste experimento foi observado que a cepa floculante utilizada não foi capaz de formar leitos estáveis em vazões superiores a 2,0L/h. Pode-se prever que a continuidade do experimento na última vazão adotada levaria a extinção do leito celular formado no reator 1, por sua vez neste caso a recíproca é verdadeira, uma vez que a adoção de vazões menores ocasionaria uma melhor fixação do leito formado ao reator, demonstrando assim que a sensibilidade do leito foi decorrente da vazão adotada no experimento.

A Figura 4.11 mostra graficamente o aumento da altura dos leitos no reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação no quarto experimento e a figura 4.12 foto dos reatores tipo torre e floculação formada em cada um deles no quarto experimento.

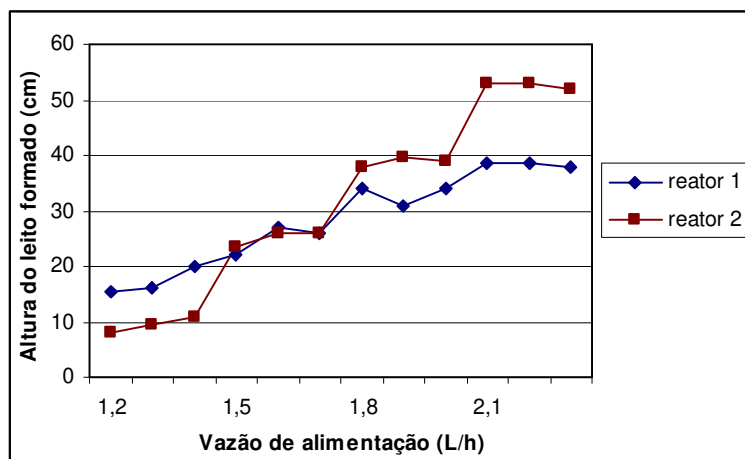


Figura 4.11 – Variação da altura do leito de células do reator 1 e 2 em função das vazões de alimentação adotadas no quarto experimento.

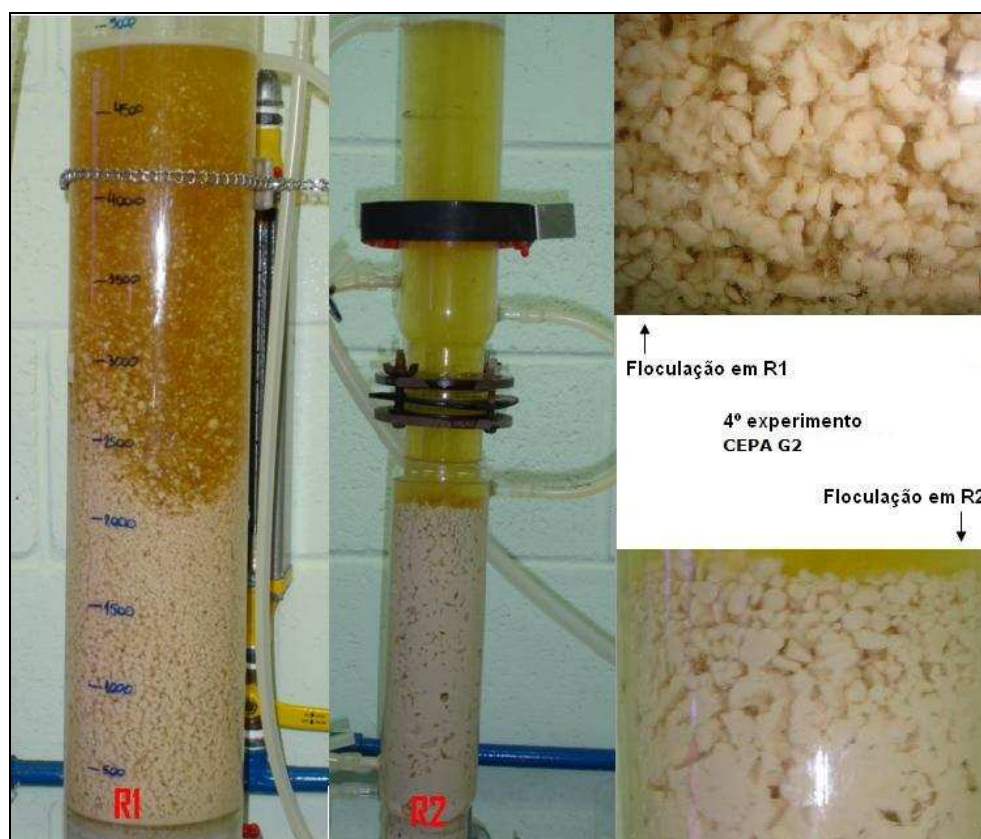


Figura 4.12 – Foto dos reatores tipo torre 1 e 2 e floculação formada em cada um deles no quarto experimento.

Observa-se pela Figura 4.11 que a cepa utilizada no quarto experimento teve um crescimento de leito sustentável em relação ao aumento das vazões, demonstrando assim grande poder de fixação nos reatores. O reator 1 obteve boa estabilidade se mantendo acima dos 40 cm de leito mesmo operando na maior vazão de alimentação adotada nos experimentos (2,1 L/h). Ambos os reatores atingiram ponto de estado estacionário por volta do décimo dia de ensaio (vazão 2,1L/h), e mantiveram-se assim mesmo após o término da coleta de dados do ensaio em questão. A cepa em G2 apresentou boa fixação nos reatores, e raramente apresentava desestabilização de leito formado, denotando assim se tratar de uma linhagem com alto poder de floculação e baixa sensibilidade ao arraste de células em virtude de modificações na vazão de alimentação.

4.4 – Avaliação do desempenho do sistema de fermentação

O desempenho do sistema fermentativo foi determinado perante análise de dados de rendimento, produção de etanol e taxa de conversão nos reatores. Os mesmos foram calculados utilizando-se as equações:

$$Rend = \frac{[E\ tan\ ol(^{\circ}GL)] * 1000}{[ART_{ent}] * 0,6475}$$

$$Prod = D * [E\ tan\ ol(^{\circ}GL)] * 10$$

$$TaxaConversão = \frac{[ART_{ent}] - [ART_{saída}]}{[ART_{saída}]} * 100$$

Onde:

[Etanol (°GL)] = Concentração final de etanol em °GL (%v/v)

[ART_{ent}] = Açúcares redutores totais que entram no sistema

[ART_{saída}] = Açúcares redutores totais que saem do sistema

0,6475 corresponde ao fator estequiométrico

D = Taxa de diluição h⁻¹ (1/tempo de residência)

A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos das análises de amostras colhidas no experimento 1, nela constam dados da quantidade de açúcares redutores totais no meio de fermentação e na saída dos reatores 1 e 2 e quantidade de etanol contido nas amostras do efluente dos reatores 1 e 2 durante os dias de ensaio.

Tabela 4.5 – Resultados de desempenho obtidos durante o experimento 1.

Dia	Meio de Fermentação (g/L)	ART na saída R1 (g/L)	ART na saída R2 (g/L)	Etanol produzido R1 (°GL)	Etanol produzido R2 (°GL)
1	153	35,8	27	6,54	7,28
2	152	36,3	19,3	6,65	7,62
3	149,8	33,8	17,4	6,54	7,85
4	161,9	47,1	22,5	6,57	7,97
5	165,2	40,5	23,7	6,99	8,48
6	167,5	37,4	23,4	7,34	8,86
7	171,9	46	28,8	7,4	8,7
8	169,7	40,2	24,5	7,69	8,96
9	167,3	34,2	22,7	8,1	9,02
10	170,1	34,6	24,1	7,91	8,7
11	168,7	37,9	25,7	7,97	8,86
12	163,1	30,6	20,6	7,85	8,96

A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos quanto ao rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 e no sistema fermentativo total e produção de etanol obtida.

Tabela 4.6 – Resultados obtidos quanto aos cálculos de rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 , no sistema fermentativo completo e produção de etanol total obtida no experimento 1.

Dias	Rendimento (%)		Taxa de Conversão (%)			Produção (g etanol/L.h)
	R1	Total	R1	R2	Total	
1	66,02	73,49	76,60	24,58	82,35	13,58
2	67,57	77,42	76,12	46,83	87,30	14,22
3	67,43	80,93	77,44	48,52	88,38	15,67
4	62,67	76,03	70,91	52,23	86,10	18,32
5	65,35	79,28	75,48	41,48	85,65	19,41
6	67,68	81,69	77,67	37,43	86,03	20,60
7	66,48	78,16	73,24	37,39	83,25	23,90
8	69,98	81,54	76,31	39,05	85,56	24,55
9	74,77	83,27	79,56	33,63	86,43	24,71
10	71,82	78,99	79,66	30,35	85,83	28,52
11	72,96	81,11	77,53	32,19	84,77	28,40
12	74,33	84,84	81,24	32,68	87,37	29,09

Observa-se pela Tabela 4.5 que oscilações ocorreram na quantidade de ART no meio de alimentação, essas oscilações ocorreram em todos os experimentos realizados. Os resultados alcançados quanto ao rendimento obtido, taxa de conversão e produção de etanol em todos os experimentos realizados estão muito abaixo do desejado para unidades industriais, no entanto vale ressaltar que a operação do sistema fermentativo realizou-se de forma extrema a sua capacidade metabólica, buscando com esse estudo avaliar o comportamento das cepas estudadas nessas condições, sem nenhuma preocupação em se atingir os parâmetros operacionais das plantas industriais.

Analisando os dados obtidos quanto ao rendimento e taxa de conversão segundo a Tabela 4.6, fica evidente que a maior parte do ART é prontamente consumido no interior do reator 1, isso se deve pela maior concentração celular no interior deste e pelas condições mais brandas encontradas neste. Pela Tabela 4.6 é possível afirmar que trabalhando com leitos estáveis no reator 1, é possível obter níveis entre 70% a 80% ou até superiores a estes valores na taxa de conversão. O reator 2 por sua vez apresentou um comportamento bem inferior ao do reator 1, esse comportamento pode ser explicado motivos por apresentar: condições menos favoráveis ao processo fermentativo, maior compactação em

seu interior com a possível formação de canais preferenciais e operar com uma menor viabilidade celular em seu interior. Em geral pode-se afirmar, portanto, que a cepa JU C4 1/00 se portou de maneira satisfatória. Foi capaz de formar leitos estáveis atingir um desempenho razoável nas condições estudadas.

A Tabela 4.7 mostra os resultados obtidos durante o experimento 2, nela constam dados da quantidade de açúcares redutores totais no meio de fermentação e na saída dos reatores 1 e 2 e quantidade de etanol produzido na saída dos reatores 1 e 2 durante os dias de ensaio.

Tabela 4.7 - Resultados de desempenho obtidos durante o experimento 2.

Dia	Meio de Fermentação (g/L)	ART na saída R1 (g/L)	ART na saída R2 (g/L)	Etanol produzido R1 (°GL)	Etanol produzido R2 (°GL)
1	153,8	36,8	19,4	7,08	8,28
2	163,4	33,9	17,6	7,92	8,42
3	160,8	29,2	16	7,95	8,82
4	180,9	38,9	24,2	8,32	9,02
5	178,8	38,6	26,2	8,12	8,75
6	178,8	39,1	22,4	8,28	9,08
7	179,8	39,9	23,5	8,18	9,01
8	178,8	39,5	25,7	7,88	8,85
9	161,9	30,6	18,9	7,68	8,75
10	167,9	63	39,1	6,09	7,38
11	171	73,5	44,2	5,95	7,28
12	175	81,9	55,7	5,65	6,75

A Tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos quanto ao rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 e no sistema fermentativo total e produção de etanol obtida no experimento 2.

Tabela 4.8 – Resultados obtidos quanto aos cálculos de rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 , no sistema fermentativo completo e produção de etanol total obtida no experimento 2.

Dias	Rendimento (%)		Taxa de Conversão (%)			Produção (g etanol/L.h)
	R1	Total	R1	R2	Total	
1	71,09	83,14	76,07	47,28	87,39	16,69
2	74,86	79,58	79,25	48,08	89,23	14,69
3	76,36	84,71	81,84	45,21	90,05	16,80
4	71,03	77,01	78,50	37,79	86,62	21,32
5	70,14	75,58	78,41	32,12	85,35	19,75
6	71,52	78,43	78,13	42,71	87,47	20,45
7	70,26	77,39	77,81	41,10	86,93	24,48
8	68,06	76,44	77,91	34,94	85,63	24,31
9	73,26	83,47	81,10	38,24	88,33	24,04
10	56,02	67,88	62,48	37,94	76,71	21,77
11	53,74	65,75	57,02	39,86	74,15	23,18
12	49,86	59,57	53,20	31,99	68,17	21,63

Como pode ser observado na tabela 4.8, a cepa G1 se mostrou susceptível ao acréscimo nas vazões de alimentação empregadas ao sistema. Pode-se constatar que numa fase inicial do experimento 2 a cepa em questão apresentou um comportamento bastante adequado à operação no sistema, com taxas de conversão de até 90% com rendimentos de até 84%, dados relativamente altos comparados aos outros experimentos. Porém a partir de certa vazão houve desestabilização no reator 1, prejudicando assim os resultados de conversão e rendimento obtidos.

A Tabela 4.9 mostra os resultados obtidos durante o experimento 3, nela constam dados da quantidade de açúcares redutores totais no meio de fermentação e na saída dos reatores 1 e 2 e quantidade de etanol produzido na saída dos reatores 1 e 2 durante os dias de ensaio.

Tabela 4.9 – Resultados de desempenho obtidos durante o experimento 3.

Dia	Meio de Fermentação (g/L)	ART na saída R1 (g/L)	ART na saída R2 (g/L)	Etanol produzido R1 (°GL)	Etanol produzido R2 (°GL)
1	159,3	43,4	40,7	7,12	7,22
2	162,4	35,3	28,7	7,95	8,25
3	178,3	65,5	43,4	6,35	8,05
4	185,7	70,1	44,5	6,42	8,02
5	176,2	46,3	27	7,58	8,85
6	165,3	40,2	15,8	7,48	9,05
7	167,6	45,4	15,9	7,08	8,85
8	165,3	41,2	19,5	7,58	9,08
9	166,5	59,2	21,7	5,95	8,82
10	158,3	46,7	23	6,35	8,22
11	159,5	45	24,2	6,49	8,35
12	165,3	73,9	34,6	4,95	8,11

A Tabela 4.10 apresenta os resultados obtidos quanto ao rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 e no sistema fermentativo total e produção de etanol obtida no experimento 3.

Tabela 4.10 – Resultados obtidos quanto aos cálculos de rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 , no sistema fermentativo completo e produção de etanol total obtida no experimento 3.

Dias	Rendimento (%)		Taxa de Conversão (%)			Produção (g etanol/L.h)
	R1	Total	R1	R2	Total	
1	69,03	70,00	72,76	6,22	74,45	14,89
2	75,60	78,46	78,26	18,70	82,33	15,48
3	55,00	69,73	63,26	33,74	75,66	15,85
4	53,39	66,70	62,25	36,52	76,04	18,48
5	66,44	77,57	73,72	41,68	84,68	20,97
6	69,89	84,55	75,68	60,70	90,44	22,57
7	65,24	81,55	72,91	64,98	90,51	23,73
8	70,82	84,83	75,08	52,67	88,20	24,95
9	55,19	81,81	64,44	63,34	86,97	24,23
10	61,95	80,20	70,50	50,75	85,47	26,69
11	62,84	80,85	71,79	46,22	84,83	25,61

12	46,25	75,77	55,29	53,18	79,07	26,33
----	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Observa-se pela Tabela 4.10 que a cepa JU C2 1/00 não conseguiu manter um leito estável no reator 1 para vazões elevadas. Este fato pode ser evidenciado em vista da grande oscilação tanto na taxa de conversão quanto no rendimento obtido neste reator em questão. Esta situação levou a um aumento acentuado na concentração de células no reator 2, fazendo com que este operasse com mais eficiência em comparação aos outros experimentos realizados. A cepa mostrou certas características desejáveis a este processo, pois mesmo nas condições adversas do ensaio foi capaz de obter rendimento na faixa de 84% e conversão de 90% segundo apresentado na Tabela 4.10. Neste experimento foi observado perda de massa celular pelo efluente do reator 2. Dessa forma, analisando o comportamento da cepa, pode-se afirmar que a mesma tem potencial para utilização nestes reatores.

A Tabela 4.11 mostra os resultados obtidos durante o experimento 4, nela constam dados da quantidade de açúcares redutores totais no meio de fermentação e na saída dos reatores 1 e 2 e quantidade de etanol produzido na saída dos reatores 1 e 2 durante os dias de ensaio.

Tabela 4.11 – Resultados de desempenho obtidos durante o experimento 4.

Dia	Meio de Fermentação (g/L)	ART na saída R1 (g/L)	ART na saída R2 (g/L)	Etanol produzido R1 (°GL)	Etanol produzido R2 (°GL)
1	157,9	45,6	34,5	6,65	7,12
2	160	48,2	33,5	6,52	7,22
3	147,3	34,2	27,6	6,95	7,38
4	167,4	42,2	28,4	7,68	8,58
5	185,4	58,4	33,1	7,38	8,75
6	168,5	43,2	23,4	7,85	8,95
7	187,3	54,8	38,4	7,42	8,58
8	179,2	54,6	29	6,92	8,78
9	182,6	48,5	25,7	7,75	9,05
10	175,7	47,2	29	7,28	8,72
11	179,2	50,2	28,3	7,22	8,72
12	175,7	45,9	27,8	7,38	9,02

A Tabela 4.12 apresenta os resultados obtidos quanto ao rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 e no sistema fermentativo total e produção de etanol obtida no experimento 4.

Tabela 4.12 – Resultados obtidos quanto aos cálculos de rendimento e taxa de conversão nos reatores 1 e 2 , no sistema fermentativo completo e produção de etanol total obtida no experimento 4.

Dias	Rendimento (%)		Taxa de Conversão (%)			Produção (g etanol/L.h)
	R1	Total	R1	R2	Total	
1	65,04	69,64	71,12	24,34	78,15	13,67
2	62,93	69,69	69,88	30,50	79,06	14,89
3	72,87	77,38	76,78	19,30	81,26	15,22
4	70,85	79,16	74,79	32,70	83,03	21,13
5	61,48	72,89	68,50	43,32	82,15	20,78
6	71,95	82,03	74,36	45,83	86,11	22,10
7	61,18	70,75	70,74	29,93	79,50	26,24
8	59,64	75,67	69,53	46,89	83,82	24,39
9	65,55	76,54	73,44	47,01	85,93	23,57
10	63,99	76,65	73,14	38,56	83,49	28,97
11	62,22	75,15	71,99	43,63	84,21	28,31
12	64,87	79,29	73,88	39,43	84,18	28,28

Com base nos dados contidos nas Tabelas 4.11 e 4.12 pode-se afirmar que a cepa G2 mostrou grande estabilidade nos reatores e resistência perante as altas vazões de alimentação empregadas. As oscilações na taxa de conversão e rendimento não foram grandes e a produção de etanol foi relativamente alta no término do experimento em relação a outras cepas estudadas.

4.5 – Testes de Flocculação

4.5.1 – Determinação de flocculação por absorbância

O teste da determinação do potencial de flocculação por absorbância foi realizado seguindo o método descrito por BENDIAK *et al.*, (1996). A Figura 4.12 apresenta os resultados obtidos seguindo o citado método.

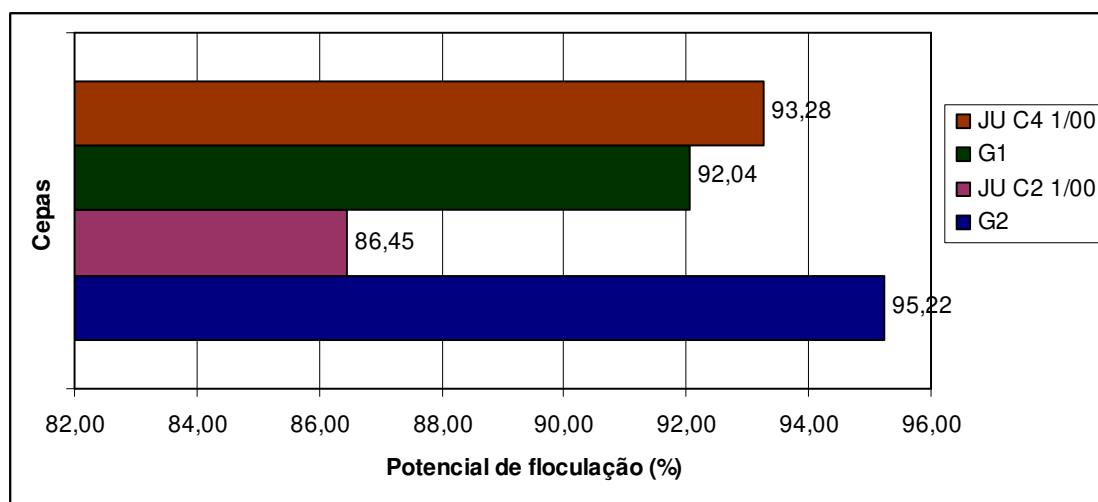


Figura 4.12 – Resultados de percentual de floculação seguindo método de determinação por absorbância.

Pela Figura 4.12 observa-se que a cepa G2 com 95,22% de poder de floculação obteve o maior resultado seguida de JU C4 1/00 com 93,28%, G1 com 92,04 e JU C2 1/00 com 86,45%. De acordo com o método utilizado para a realização deste ensaio o percentual de 20% ou menor é classificado como cepa não floculante, entre 20% a 85% como moderadamente floculante e acima de 85% como muito floculante. Desta forma, de acordo com o método utilizado, pode-se afirmar que todas as cepas estudadas possuem em maior ou menor grau a característica de forte floculação.

4.5.2 – Identificação dos genes responsáveis pela floculação e avaliação do nível de expressão

O RNA total das linhagens foi hibridado com as sondas referentes aos genes *FLO1* (Figura 4.13) e *FLO10* (Figura 4.14).

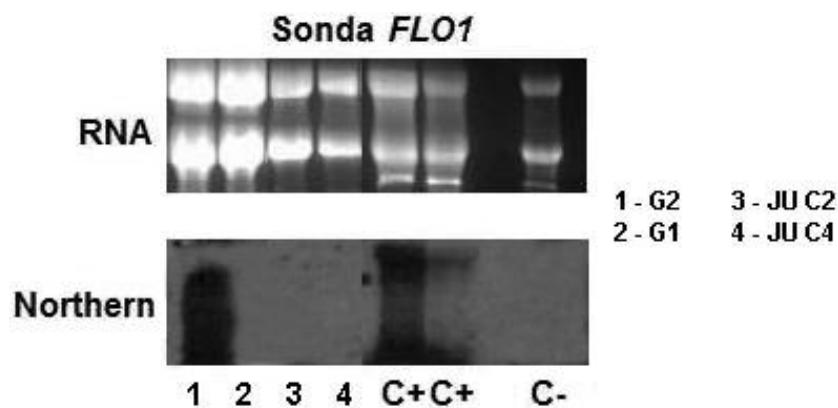


Figura 4.13 – Experimento de *Northern blotting* do gene *FLO1* com as linhagens utilizadas nos experimentos

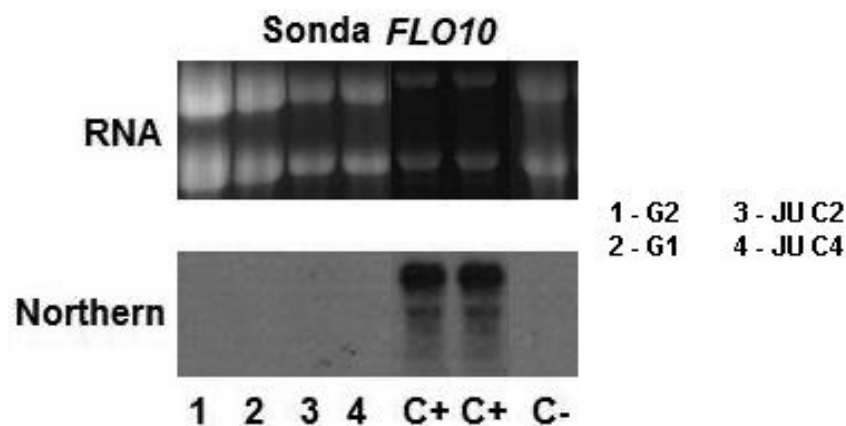


Figura 4.14 – Experimento de *Northern blotting* do gene *FLO10* com as linhagens utilizadas nos experimentos

As análises do resultado de *Northern blotting* apresentados na Figura 4.13 demonstram hibridação apenas na cepa G2 e controles positivos. Através desta constatação pode-se afirmar que o gene *FLO1* é o principal responsável na floculação da linhagem G2 (linhagem que apresentou maior poder de floculação), no entanto não foi determinante no processo de agregação/floculação das demais linhagens estudadas. Já as análises do resultado de *Northern blotting* apresentados na Figura 4.14 demonstram que o gene *FLO10* não é responsável pela floculação natural das linhagens estudadas, uma vez que pode ser observado na mesma apenas a hibridação do controle positivo.

4.6 – Comparativo entre as diferentes linhagens estudadas.

4.6.1 – Altura do leito celular formado nos reatores

A Tabela 4.13 apresenta os dados de altura (cm) do leito celular formado no reator 1 para todas as linhagens de leveduras floculantes estudadas nos experimentos em relação às diferentes vazões de alimentação (L/h).

Tabela 4.13 – Altura do leito celular em R1 (cm) em relação a vazão de alimentação (L/h).

Vazões (L/h)	Altura do leito em R1 (cm)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	12	25	13	15,5
	25	26	15,5	16
	32	30	15	20
1,5	30	30	15	22
	32	36	27	27
	33	34	28	26
	40	36	28	34
1,8	43	42	28	31
	42	32	28	34
	38	24	24	38,5
2,1	34	26	20	38,5
	34,5	13	17	38

A Figura 4.15 apresenta a altura do leito celular formado pelo reator 1 com todas linhagens de leveduras floculantes analisadas nos experimentos em relação as diferentes vazões de alimentação (L/h) com meio fermentativo.

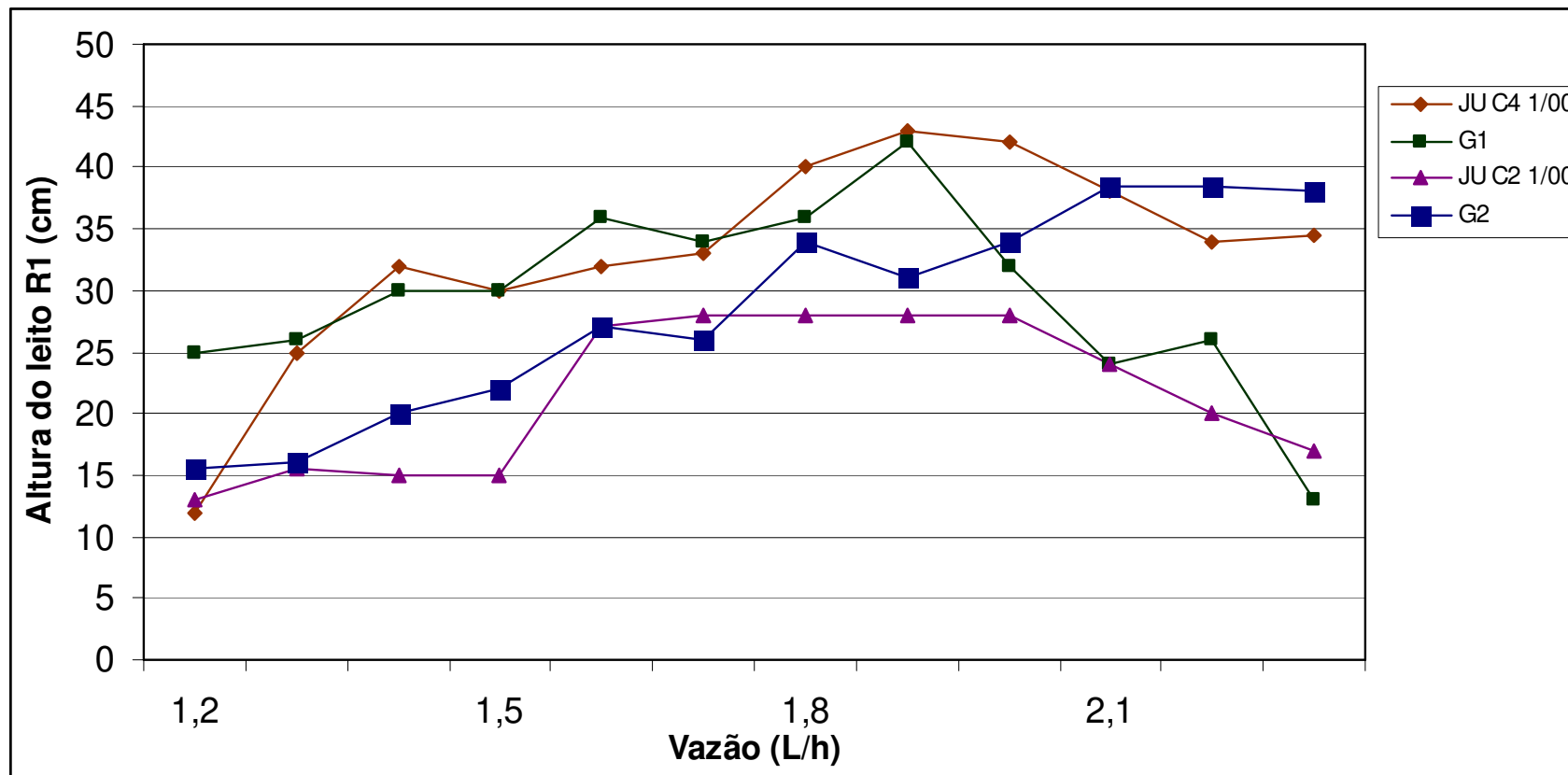


Figura 4.15 – Altura do leito celular formado pelo reator 1 com todas linhagens de leveduras floculantes analisadas em função das diferentes vazões de alimentação(L/h)

Observa-se pela Figura 4.15 que as cepas JU C4 1/00 e G2 tiveram um bom desenvolvimento ao longo de todo experimento, não foram susceptíveis ao acréscimo nas vazões e mantiveram os leitos estáveis para todas as condições estudadas. Em diferente situação as cepas JU C2 1/00 e G1 demonstraram certa sensibilidade ao aumento da vazão de alimentação, levando a desestabilização de seus leitos neste reator e conseqüentemente a saída e perda de parte de suas células para o reator 2, levando ao aumento precoce do leito formado nesse reator, não ocorrido em função do desenvolvimento em si mas sim das células exclusas no primeiro reator pouco estável. Pode-se afirmar com base nos resultados mostrados nas tabelas 8, 10, 12 e 14 que é de enorme importância o crescimento e manutenção da estabilidade no leito de células formado no reator 1. Foi demonstrado também com base nas tabelas acima citadas que leitos estáveis combinados com cepas dotadas de boas características fermentativas foram capazes de alcançar resultados de até 81% na taxa de conversão e 76% no rendimento, o que vem a confirmar a importância deste primeiro reator no sistema de fermentação com biorreatores tipo torre como um todo.

A Tabela 4.14 apresenta os dados de altura (cm) do leito celular formado no reator 2 com todas as linhagens de levedura floculantes analisadas nos experimentos em relação às diferentes vazões de alimentação(L/h) com meio fermentativo.

Tabela 4.14 – Altura do leito celular em R2 (cm) em relação às vazões de alimentação (L/h).

Vazões (L/h)	Altura do leito em R2 (cm)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	15,5	33	5,5	8
	14,5	37	7	9,5
	18,5	37	7,5	11
1,5	18,5	49	19	23,5
	21,5	44	39,5	26
	27	46	43	26
1,8	31	54	49	38
	50	46	59	39,5
	43	53	59	39
2,1	51	54	56	53
	55	56	55	53
	56	57	59	52

A figura 4.16 apresenta a altura do leito celular formado pelo reator 2 com todas linhagens de levedura floculantes analisadas nos experimentos em relação as diferentes vazões de alimentação(L/h) com meio fermentativo.

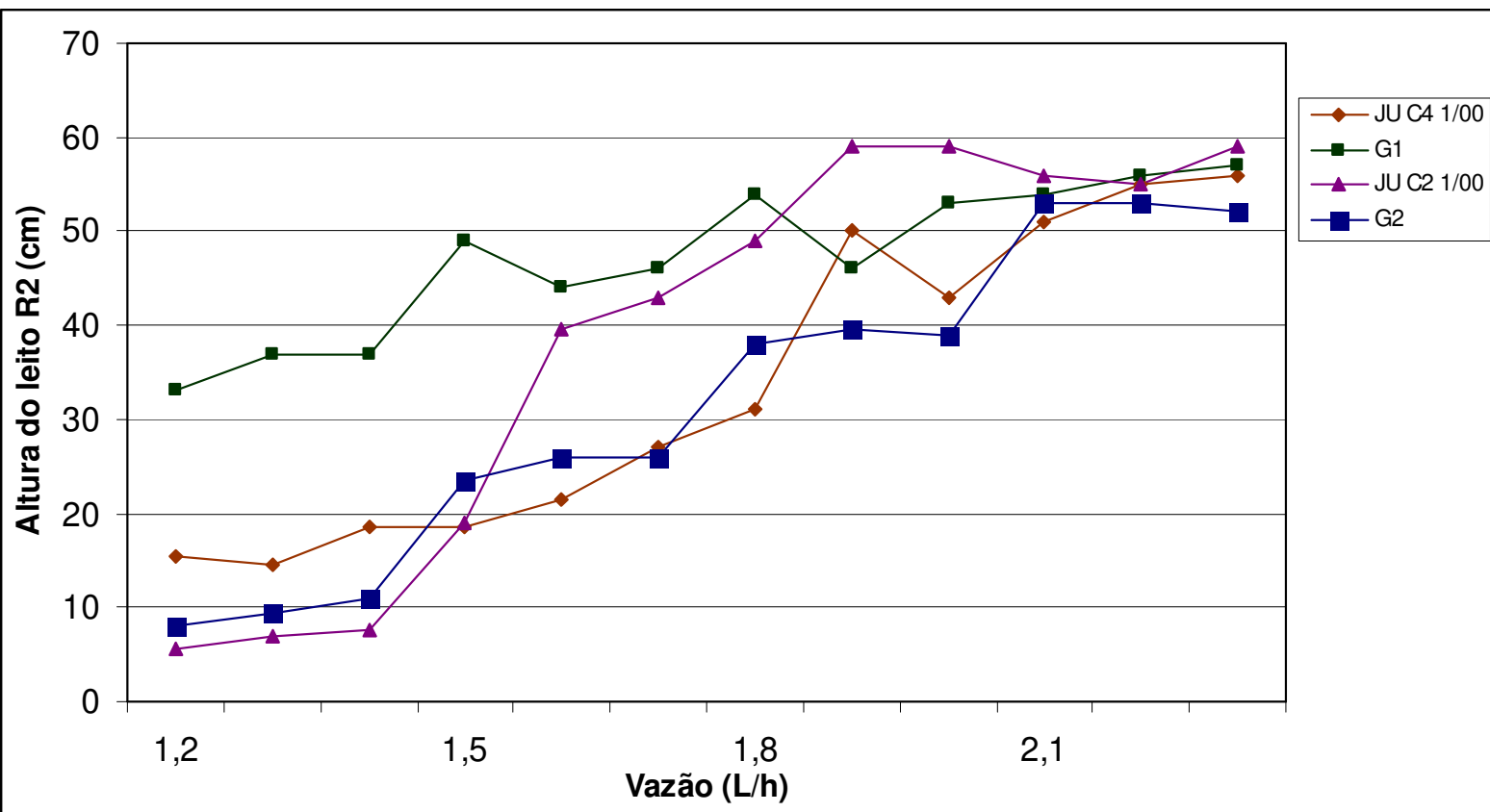


Figura 4.16 – Altura do leito celular formado pelo reator 2 com todas linhagens de leveduras flocculantes analisadas em função das diferentes vazões de alimentação(L/h)

Nota-se pela Figura 4.16 que as cepas que mostraram melhor desempenho e estabilidade no reator 2 foram JU C4 1/00 e G2, pois mantiveram um

crescimento sustentável, em conjunto com o reator 1 durante todo o ensaio realizado. As linhagens G1 e JU C2 1/00 por sua vez foram bastante susceptíveis as altas vazões de alimentação impostas, levando a uma grande saída de parte do leito celular formado no reator 1 para o reator 2. Nestes casos, observa-se então uma estagnação da altura de leito no primeiro reator e um crescimento desproporcional em comparação a este no segundo reator.

4.6.2 – Taxa de conversão

A Tabela 4.15 apresenta dados da taxa de conversão dos açúcares redutores totais no reator 1 nos ensaios com todas as linhagens de levedura floculantes em relação às diferentes vazões de alimentação utilizadas.

Tabela 4.15 – Taxa de conversão em R1 em relação às vazões de alimentação

Vazões (L/h)	Taxa de conversão (%)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	76,6	76,07	72,76	71,12
	76,12	79,25	78,26	69,88
	77,44	81,84	63,26	76,78
1,5	70,91	78,5	62,25	74,79
	75,48	78,41	73,72	68,5
	77,67	78,13	75,68	74,36
1,8	73,24	77,81	72,91	70,74
	76,31	77,91	75,08	69,53
	79,56	81,1	64,44	73,44
2,1	79,66	62,48	70,5	73,14
	77,53	57,02	71,79	71,99
	81,24	53,2	55,29	73,88

A figura 4.17 apresenta graficamente dados da taxa de conversão dos açúcares redutores totais no reator 1 nos ensaios com todas as linhagens de levedura floculantes em relação às diferentes vazões de alimentação utilizadas.

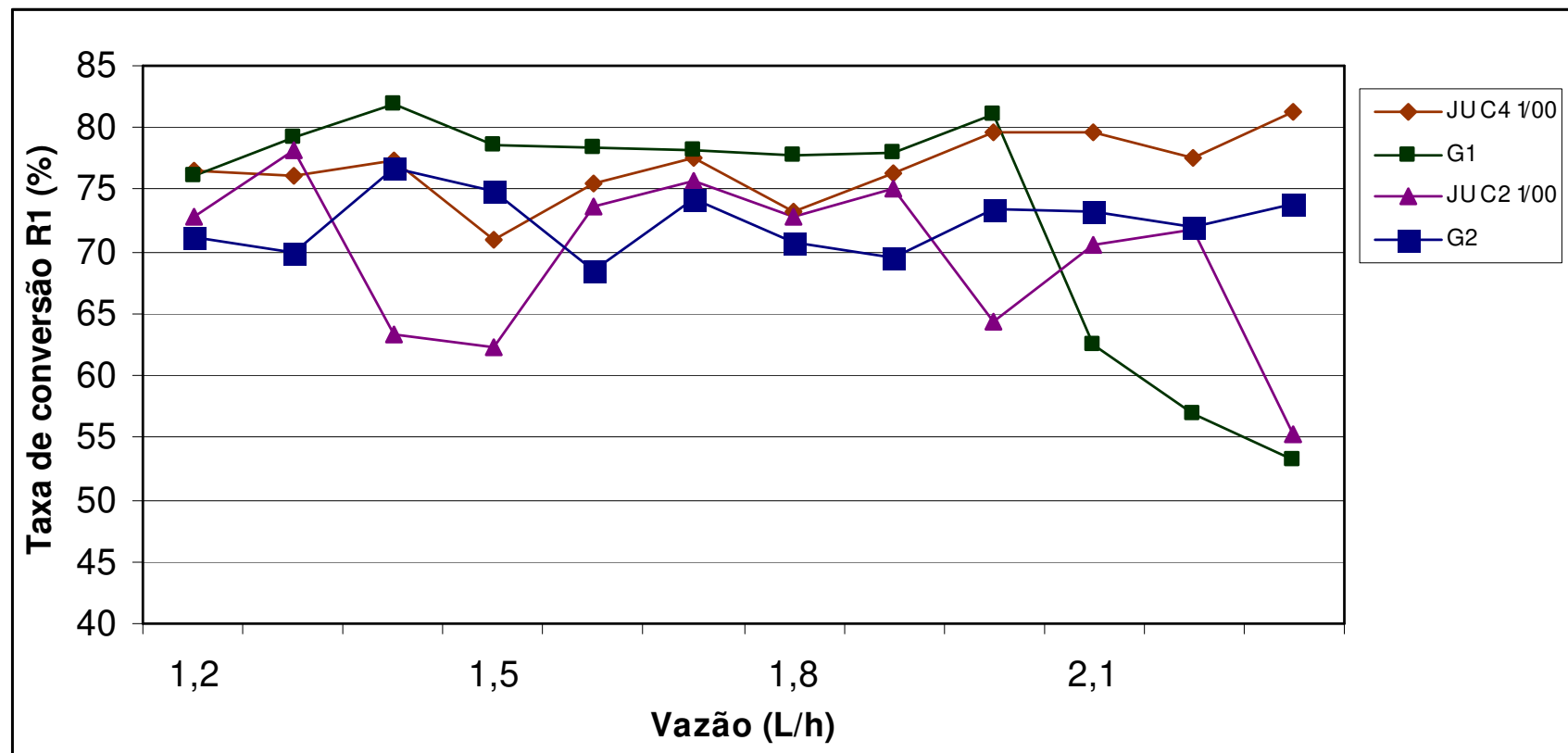


Figura 4.17 – Taxa de conversão em R1 em relação às diferentes vazões utilizadas.

Observa-se pela Tabela 4.15 e Figura 4.17 que em geral baixas taxas de conversão foram obtidas já que os ensaios visaram a comparação das cepas estudadas em condições extremas de operação. Não foi objetivo deste trabalho determinar as condições ótimas de operação de uma unidade industrial, as quais levariam a um rendimento máximo. Observa-se que as linhagens JU C4 1/00 e G1 apresentaram as melhores médias na taxa de conversão no reator 1, apesar desta última cepa ter demonstrado certa fragilidade quando imposta vazão de 2,1 L/h, tendo parte de seu leito celular perdido e consequentemente drástica queda no valor de taxa de conversão. A cepa JU C2 1/00 apresentou um comportamento bastante oscilatório, isso se deve pelo seu comportamento em que por vezes se fixava adequadamente no reator 1 e convertia adequadamente os açúcares alimentados porém em outros momentos tinha seu leito drasticamente desestabilizado, perdendo grande parte de seu conteúdo celular para o segundo reator. A linhagem G2 mostrou boa estabilidade no reator 1, se fixando adequadamente a este com grande poder de floculação. Sua taxa de conversão teve pouca oscilação independente das vazões impostas, e em comparação a outras cepas, esta apresentou menor taxa de conversão de açúcares neste primeiro reator, este fato pode estar vinculado a sua floculação intensa que acaba diminuindo a área de contato das células com o substrato.

A tabela 4.16 apresenta dados da taxa de conversão dos açúcares redutores totais no reator 2 em todos ensaios em função das vazões utilizadas.

Tabela 4.16 – Taxa de conversão em R2 em relação às vazões de alimentação

Vazões	Taxa de conversão (%)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	24,58	47,28	6,22	24,34
	46,83	48,08	18,7	30,5
	48,52	45,21	33,74	19,3
	52,23	37,79	36,52	32,7
1,5	41,48	32,12	41,68	43,32
	37,43	42,71	60,7	45,83
	37,39	41,1	64,98	29,93
	39,05	34,94	52,67	46,89
1,8	33,63	38,24	63,34	47,01
	30,35	37,94	50,75	38,56
	32,19	39,86	46,22	43,63
	32,68	31,99	53,18	39,43

A figura 4.18 apresenta graficamente dados da taxa de conversão dos açúcares redutores totais no reator 2 nos ensaios com todas as linhagens de levedura floculantes em relação às diferentes vazões de alimentação utilizadas.

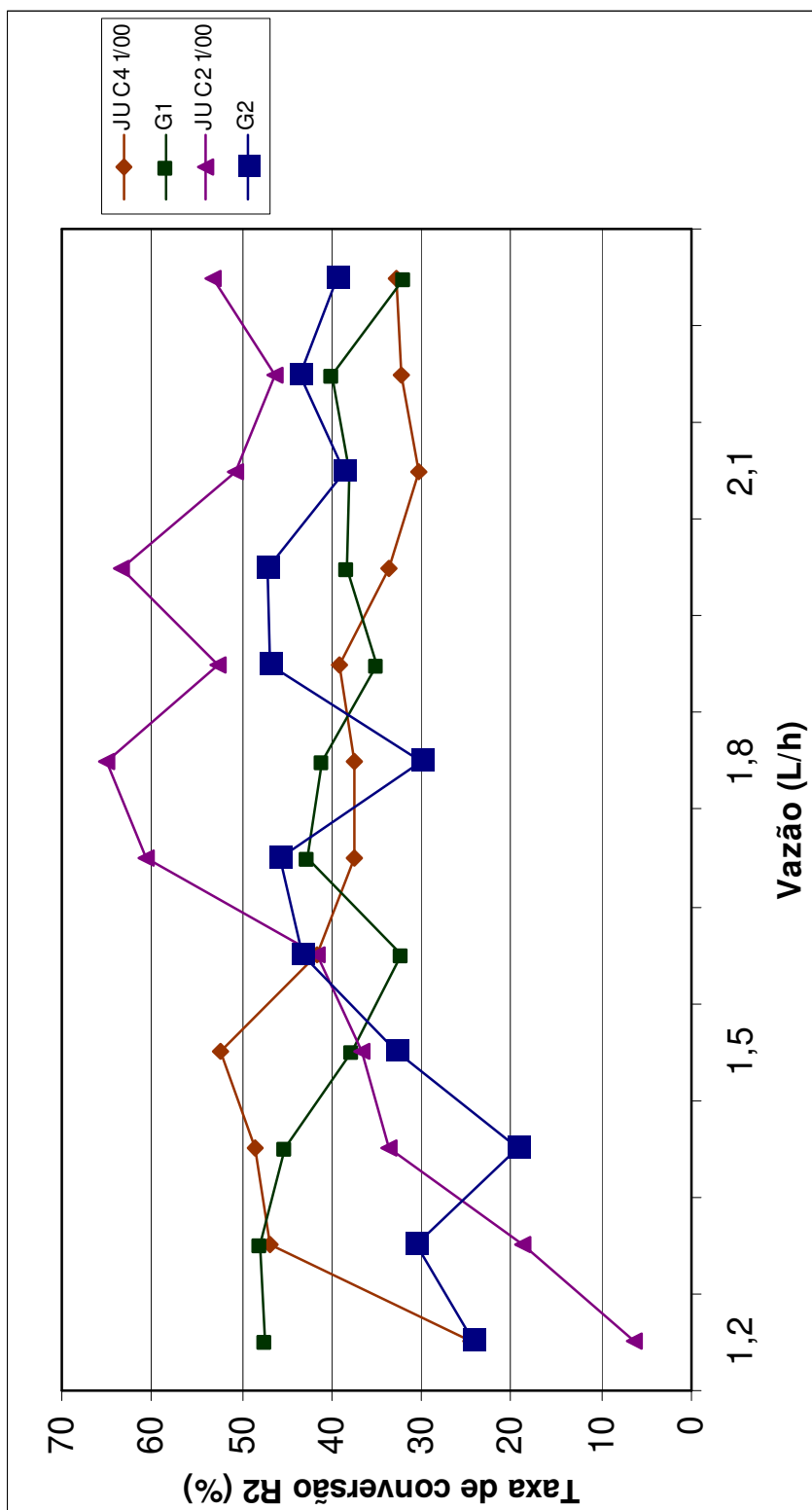


Figura 4.18 – Taxa de conversão em R2 em relação as diferentes vazões utilizadas

Observa-se pela Figura 4.18 e Tabela 4.16 que no reator 2 do experimento com a cepa JU C4 1/00 pouca taxa de conversão foi notada. Isto se deve,

segundo dados analisados anteriormente, a uma conversão eficiente no reator 1 restando dessa forma uma menor quantidade de açúcares para este. O rendimento dessa linhagem também foi afetado pelo aumento nas vazões de alimentação, sendo mais notadamente averiguada entre 1,8 e 2,1 L/h, com baixas taxas de conversão, na faixa dos 30 a 35%. Em situação semelhante se encontra a cepa G1, que obteve boas taxas de conversão em ambos os reatores mas foi susceptível ao acréscimo nas vazões. A cepa JU C2 1/00 mostrou comportamento bastante oscilatório em razão da forte desestabilização do leito celular ocorrido no reator 1 com certa frequência, essas desestabilizações no primeiro reator eram compensadas com altas taxas de conversão no segundo reator. A linhagem G2 foi pouco susceptível as vazões empregadas, tendo sua taxa de conversão aumentada do decorrer do experimento, finalizando os ensaios com cerca de 40% de conversão no segundo reator.

A Tabela 4.17 apresenta dados da taxa de conversão em relação as diferentes vazões utilizadas no sistema fermentativo completo com todas as linhagens estudadas.

Tabela 4.17 – Taxas de conversão obtidas no sistema fermentativo completo em todos os experimentos realizados em função das diferentes vazões adotadas.

Vazões (L/h)	Taxa de conversão (%)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	82,35	87,39	74,45	78,15
	87,3	89,23	82,33	79,06
	88,38	90,05	75,66	81,26
1,5	86,1	86,62	76,04	83,03
	85,65	85,35	84,68	82,15
	86,03	87,47	90,44	86,11
1,8	83,25	86,93	90,51	79,5
	85,56	85,63	88,2	83,82
	86,43	88,33	86,97	85,93
2,1	85,83	76,71	85,47	83,49
	84,77	74,15	84,83	84,21
	87,37	68,17	79,07	84,18

A figura 4.19 apresenta graficamente dados da taxa de conversão dos açúcares redutores totais no sistema fermentativo completo em todos os ensaios realizados em relação às diferentes vazões de alimentação utilizadas.

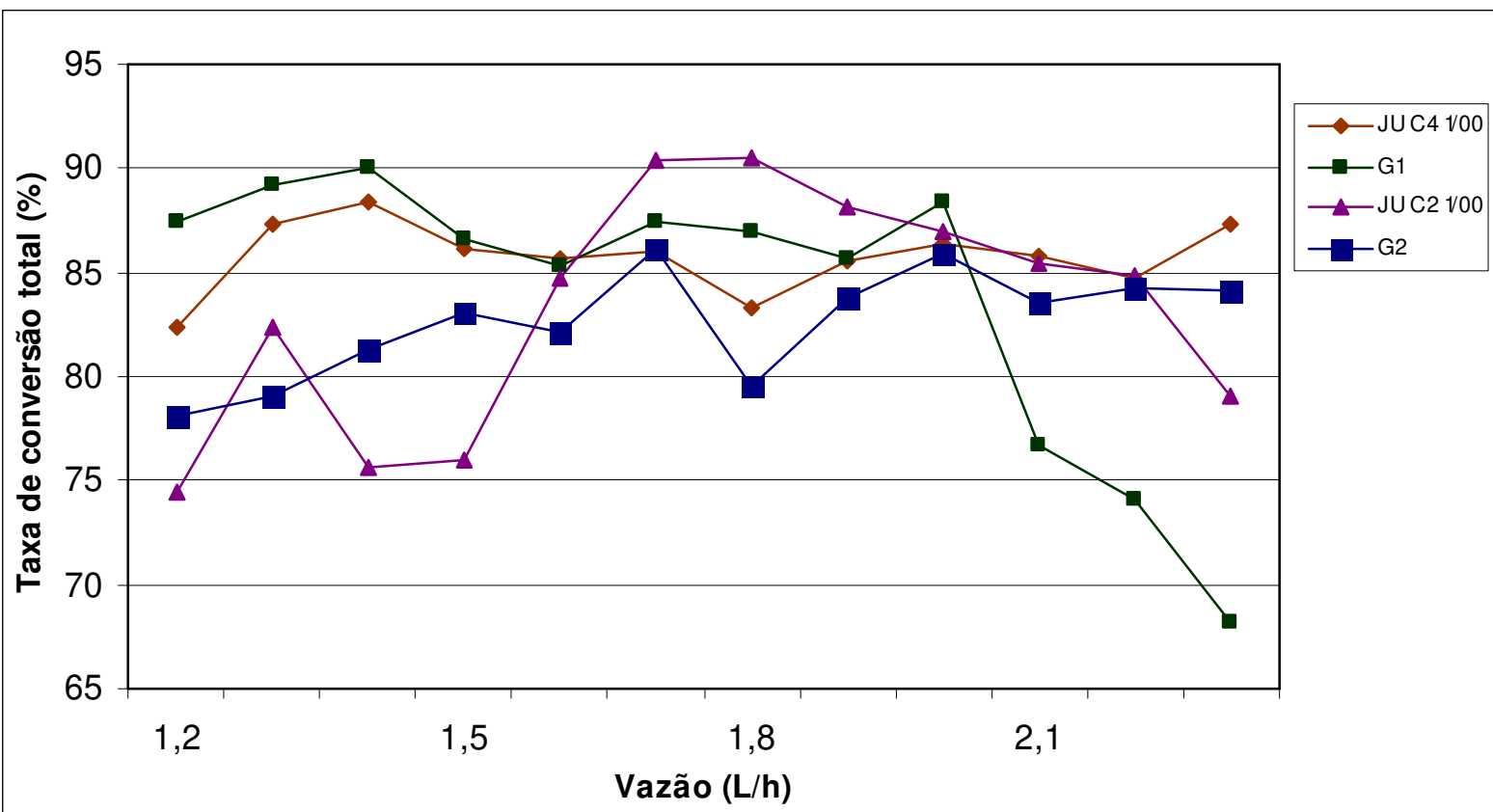


Figura 4.19 – Taxa de conversão em relação as diferentes vazões adotadas no sistema fermentativo completo com todas as cepas utilizadas nos experimentos

Nota-se pela Tabela 4.17 e Figura 4.19 que de forma geral as cepas utilizadas tiveram uma taxa de conversão tida como aceitável entre a faixa dos 1,2

a 1,8 L/h de alimentação aos reatores. Nessa situação a cepa com melhor desempenho foi a G1, com média entre os 9 dias de ensaio (vazão 1,2 a 1,8 L/h) de 87,4% na taxa de conversão, seguidas desta estão as cepas JU C4 1/00 com 85,67%, JU C2 1/00 com 83,25% e por fim G2 com 82,11. Em análise aos 12 dias adotados, a linhagem que obteve melhor resultado foi a JU C4 1/00 com média de 85,75% na conversão dos açúcares nos 12 dias de ensaio, seguidas desta estão as cepas G1 com 83,83%, JU C2 1/00 com 83,22% e G2 com 82,57%. Afirma-se, portanto, que as linhagens G1 e JU C4 1/00 apresentaram os melhores resultados segundo a taxa de conversão de ART durante os ensaios realizados.

4.6.3 – Rendimento

A tabela 4.18 apresenta dados do rendimento obtido em função das vazões adotadas no reator 1 em todos os ensaios realizados com as diferentes linhagens estudadas.

Tabela 4.18 – Rendimento obtido no reator 1 em relação as diferentes vazões adotadas nos ensaios com todas as linhagens estudadas.

Vazões (L/h)	Rendimento (%)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	66,02	71,09	69,03	65,04
	67,57	74,86	75,6	62,93
	67,43	76,36	55	72,87
1,5	62,67	71,03	53,39	70,85
	65,35	70,14	66,44	61,48
	67,68	71,52	69,89	71,95
1,8	66,48	70,26	65,24	61,18
	69,98	68,06	70,82	59,64
	74,77	73,26	55,19	65,55
2,1	71,82	56,02	61,95	63,99
	72,96	53,74	62,84	62,22
	74,33	49,86	46,25	64,87

A figura 4.20 apresenta graficamente o rendimento obtido no reator 1 em função das diferentes vazões utilizadas nos ensaios com todas as cepas estudadas.

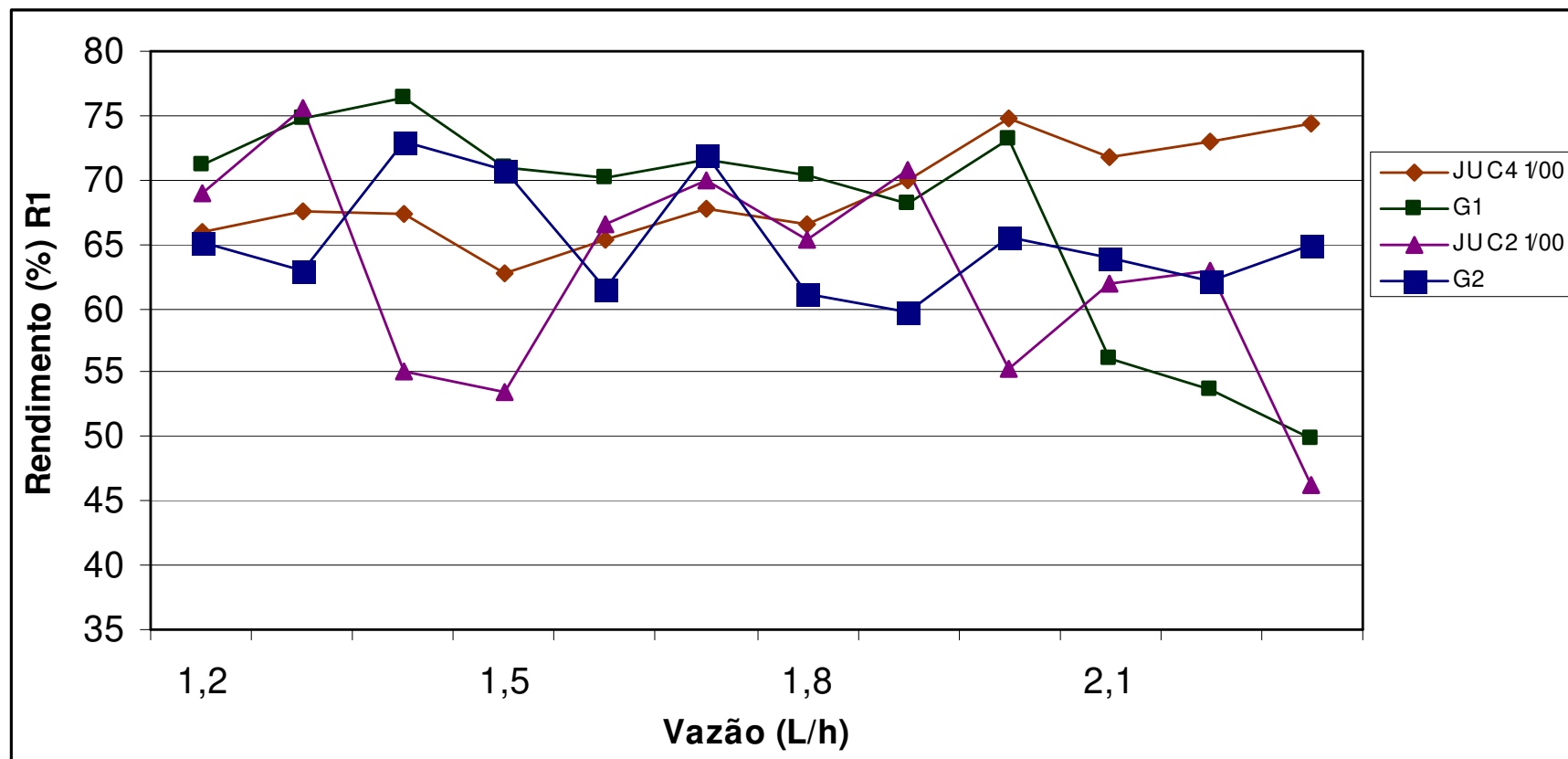


Figura 4.20 – Rendimento obtido no reator 1 em função das diferentes vazões utilizadas nos ensaios com todas as linhagens estudadas

Observa-se pela tabela 4.18 e figura 4.20 que de forma geral o rendimento alcançado no reator 1 nos experimentos realizados se situou na faixa entre 60 a 75%, com algumas oscilações fora desses valores. A cepa JU C4 1/00 teve um rendimento abaixo dos 70% em boa parte do experimento, mas apresentou um melhor desempenho no final dos ensaios. Em contrapartida, a cepa G1 apresentou bom rendimento no reator 1 no início dos ensaios, porém a partir da adoção da vazão de 2,1 L/h, esta apresentou decréscimo em relação aos seus valores iniciais. A cepa JU C2 1/00 apresentou comportamento oscilatório como já visto em outros dados analisados anteriormente, e de forma geral apresentou baixo rendimento neste reator. A linhagem G2 teve pouca variação nos dados obtidos em todo o ensaio, porém baixo rendimento em relação às demais cepas avaliadas neste trabalho.

A tabela 4.19 apresenta dados dos rendimentos obtidos em função das diferentes vazões utilizadas no sistema fermentativo completo durante os ensaios com todas as linhagens de levedura floculantes estudadas.

Tabela 4.19 – Rendimento no sistema fermentativo completo em todos os experimentos realizados em função das diferentes vazões adotadas.

Vazões (L/h)	Rendimento (%)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1,2	73,49	83,14	70	69,64
	77,42	79,58	78,46	69,69
	80,93	84,71	69,73	77,38
1,5	76,03	77,01	66,7	79,16
	79,28	75,58	77,57	72,89
	81,69	78,43	84,55	82,03
1,8	78,16	77,39	81,55	70,75
	81,54	76,44	84,83	75,67
	83,27	83,47	81,81	76,54
2,1	78,99	67,88	80,2	76,65
	81,11	65,75	80,85	75,15
	84,84	59,57	75,77	79,29

A figura 4.21 apresenta graficamente dados do rendimento no sistema fermentativo completo em função das diferentes vazões utilizadas com todas as linhagens estudadas.

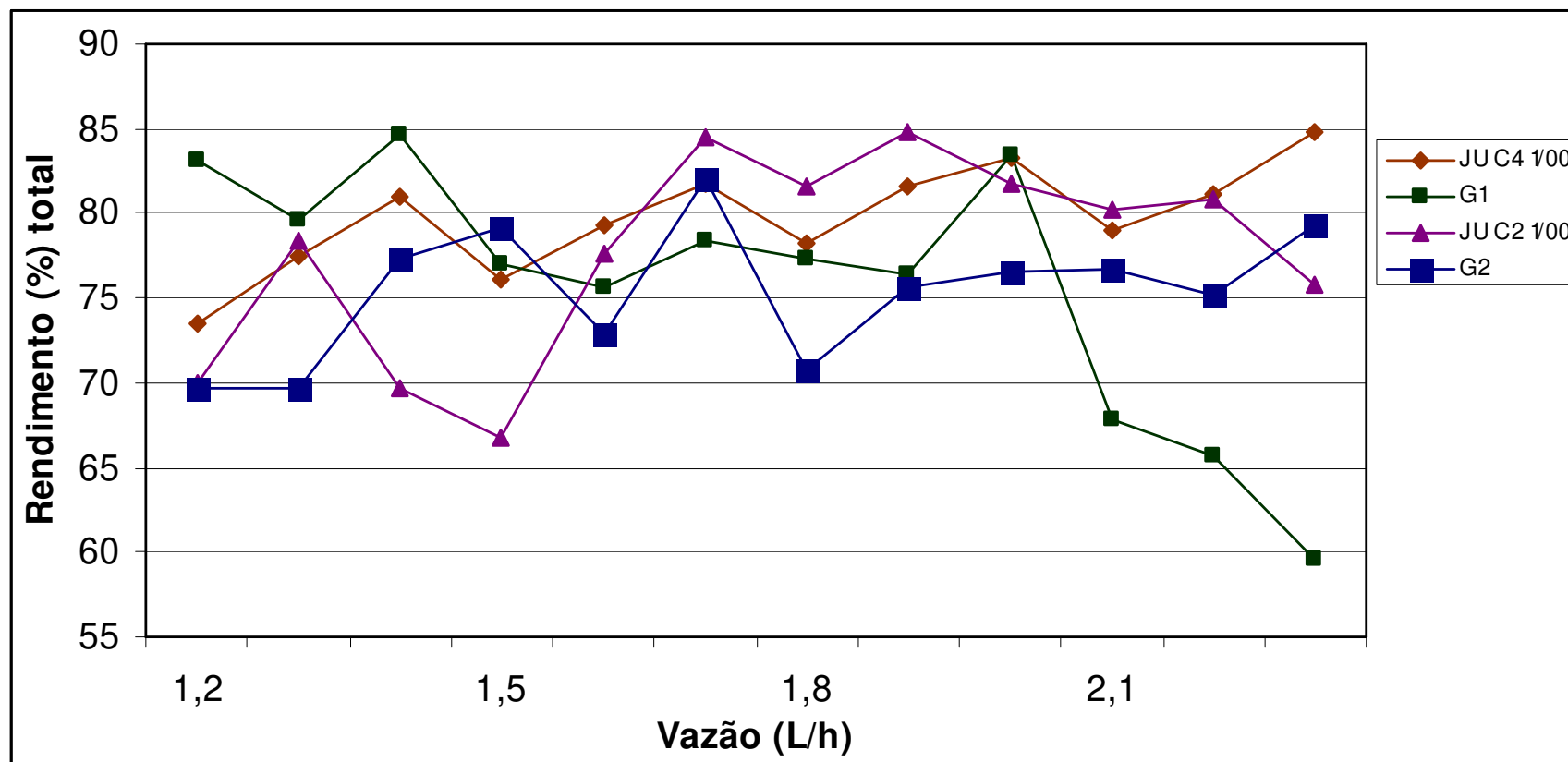


Figura 4.21 – Rendimento obtido em função das diferentes vazões utilizadas no sistema fermentativo completo com todas as linhagens estudadas.

Nota-se pela tabela 4.19 e figura 4.21 que os dados obtidos quanto ao rendimento no sistema fermentativo completo trabalhando com as quatro diferentes linhagens estudadas demonstraram um comportamento oscilatório. Isso se deve em função da alteração constante nas vazões de alimentação, fato este notado pela queda no rendimento quando o sistema era submetido a uma nova vazão, e logo após adaptação a esta nova situação um rendimento superior era observado. Em geral, as cepas estudadas apresentaram comportamento semelhante ao observado pelos dados obtidos quanto a taxa de conversão, esse fato já era esperado já que o rendimento é dependente do nível de conversão dos açúcares redutores totais. Dessa forma podemos afirmar que perante os ensaios realizados a cepa que apresentou melhor rendimento foi a JU C4 1/00 com 79,73%, seguidas desta estão JU C2 1/00 com 77,67%, G1 com 75,74% e G2 com 75,40%. Se analisado o período que em geral apresentou os melhores rendimentos (9 dias/vazões 1,2 a 1,8 L/h) teremos que a cepa G1 com 79,53% demonstrou melhores resultados seguida de JU C4 1/00 com 79,09%, JU C2 1/00 com 77,24% e G2 com 74,86% de rendimento.

4.6.4 – Produção de etanol

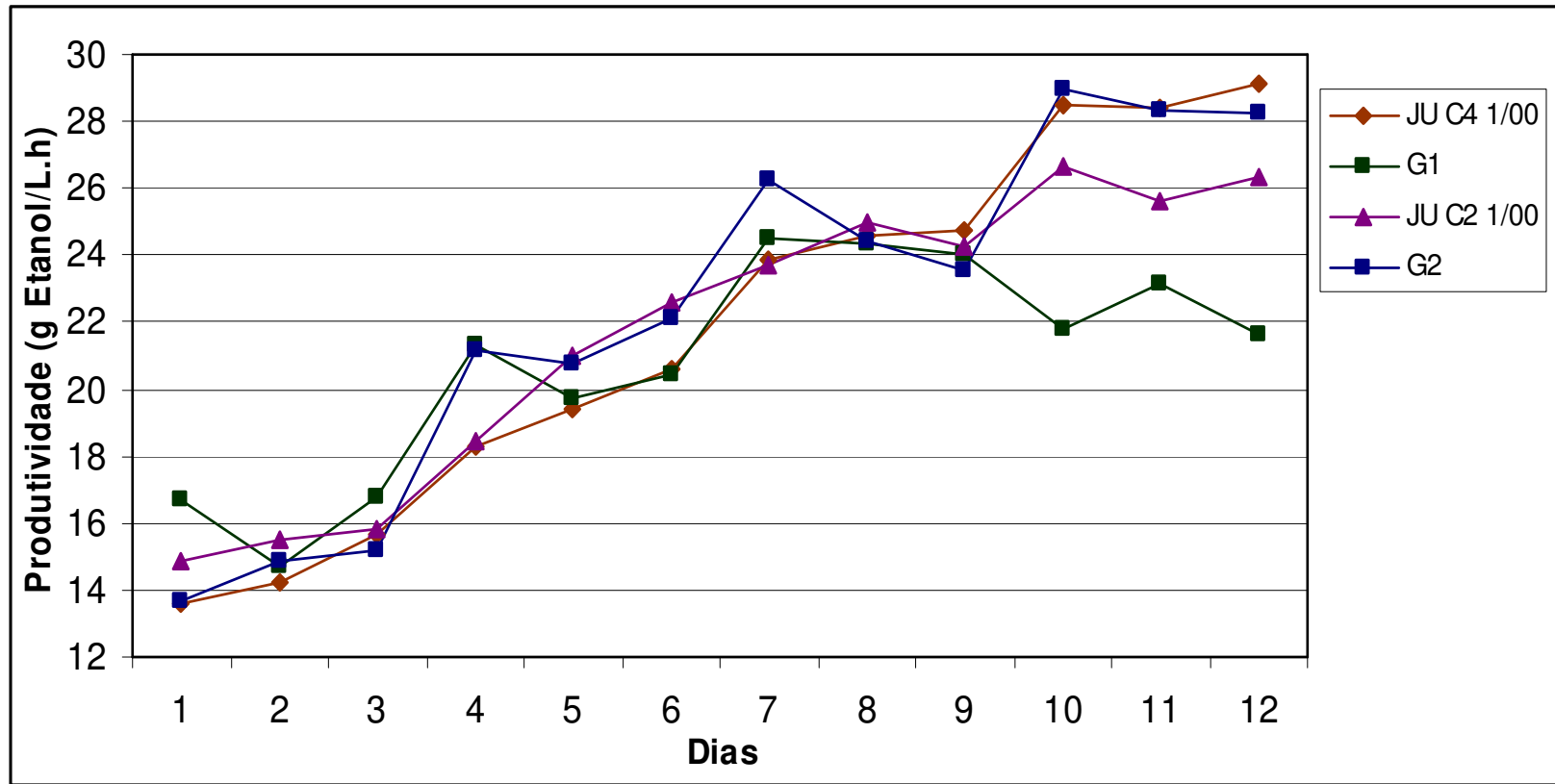
A tabela 4.20 apresenta os resultados obtidos quanto a produção de etanol no sistema fermentativo completo durante os dias de ensaio com as diferentes cepas analisadas.

Tabela 4.20 – Produtividade durante os dias de ensaio com as diferentes cepas analisadas.

Dias	Produção (g Etanol/L.h)			
	JU C4 1/00	G1	JU C2 1/00	G2
1	13,58	16,69	14,89	13,67
2	14,22	14,69	15,48	14,89
3	15,67	16,80	15,85	15,22
4	18,32	21,32	18,48	21,13
5	19,41	19,75	20,97	20,78
6	20,60	20,45	22,57	22,10
7	23,90	24,48	23,73	26,24
8	24,55	24,31	24,95	24,39
9	24,71	24,04	24,23	23,57
10	28,52	21,77	26,69	28,97
11	28,40	23,18	25,61	28,31
12	29,09	21,63	26,33	28,28

A figura 4.22 apresenta graficamente dados da produção de etanol no sistema fermentativo completo durante os dias de ensaio com as quatro cepas analisadas.

Figura 4.22 – Dados de produção de etanol em relação aos dias de ensaio com as quatro diferentes linhagens estudadas.



Observa-se pela tabela 4.20 e figura 4.22 que com exceção da cepa G1, todas as outras linhagens trabalhadas apresentaram um acréscimo na quantidade de etanol produzido em relação ao decorrer dos dias e aumento nas vazões de alimentação impostas. Apesar de algumas cepas apresentarem dados de produção satisfatórios, pode ser observado em resultados anteriores, quanto ao desempenho do sistema fermentativo nos quatro experimentos realizados, (tabelas 4.5, 4.7, 4.9 e 4.11) que em determinadas situações dos ensaios grande parte dos açúcares redutores eram eliminados do sistema. Foi observada também uma diferença na concentração inicial de ART alimentado aos reatores, o que levou em alguns casos a uma maior produção de etanol em concentrações elevadas desses açúcares, o que não significa necessariamente que uma linhagem seja dotada de um metabolismo superior às outras na produção de etanol. Essas constatações vêm a fortalecer a importância na manutenção de um ponto ótimo de operação para o trabalho com biorreatores tubulares tipo torre em sistema contínuo de produção de etanol utilizando linhagens de levedura floculantes. Assim, constata-se que a cepa G2 foi a que apresentou melhores médias quanto a produção de etanol com 22,29g etanol/L.h seguida de JU C4 1/00 com 21,75g etanol/L.h, JU C2 1/00 com 21,65g etanol/L.h e G1 com 20,76g etanol/L.h. Operando em um cenário diferente (9 dias/vazões 1,2 a 1,8) as cepas com melhores médias de produção foram G1 com 20,28g etanol/L.h seguida de G2 com 20,22g etanol/L.h, JU C2 1/00 com 20,13g etanol/L.h e JU C4 1/00 com 19,44g etanol/L.h.

Capítulo 5

5 Conclusões

- ✓ O sistema de fermentação contínua operando com reatores tubulares (tipo torre) e cepas de levedura floclulantes mostrou-se eficaz e operacional desde que adotado um ponto ótimo de operação que respeite os limites metabólicos de cada linhagem utilizada.
- ✓ Grande atenção deve ser dada à estabilidade no leito celular formado no primeiro reator, já que foi constatado que entre 50 a 70% da conversão dos açúcares ocorrem neste. Leitos mal fixados aos reatores são arrastados pelo dióxido de carbono gerado levando a uma redução na concentração celular no interior destes provocando assim redução na taxa de conversão e rendimento e consequentemente na produção de etanol.
- ✓ Algumas modificações podem ser realizadas a fim de se obter melhores resultados no sistema fermentativo trabalhado, a adoção de um terceiro reator em série e/ou de um recipiente ao final dos dois reatores atuando como tanque decantador das células exclusas com reciclo aos biorreatores, são estratégias que se adotadas visam cessar os açúcares restantes presentes no substrato e manter um bom volume celular no leito dos biorreatores.
- ✓ Foi demonstrado pelos experimentos realizados que as linhagens estudadas possuem suas peculiaridades quanto ao grau de expressão dos genes responsáveis pela floclulação e metabolismo na produção de etanol. Trabalhos futuros poderão se utilizar desses perfis com grandes chances de obtenção de êxito.

- ✓ De forma geral cada cepa apresentou diferentes características na sua forma de trabalho em biorreatores fluidizados. As linhagens JU C4 1/00 e G1 mostraram-se dotadas de bons perfis metabólicos na produção de etanol e com um conveniente poder de floculação, pode-se afirmar que as duas apresentaram as condições operacionais mais favoráveis no trabalho com esse tipo de biorreatores. A última citada por sua vez, teve seu comportamento afetado pela aplicação de altas vazões de alimentação de substrato, levando a desestabilização do leito celular formado, mas que se utilizada em condições apropriadas de trabalho terá êxito frente a outras linhagens estudadas. A cepa JU C2 1/00 apresentou também um bom perfil metabólico na conversão de açúcares a etanol, seu menor poder de floculação frente às outras cepas, no entanto, levou a grande desestabilização do leito formado, a obrigando a trabalhar com os dois reatores de forma conjunta, e não utilizando o segundo reator como um coadjuvante do processo, mesmo nessas condições a cepa apresentou bons resultados. A linhagem G2 foi a que apresentou maior poder de floculação e por vezes foi notado que essa sua característica gerava leitos altamente compactos em baixas vazões de alimentação de substrato levando a reduzidas taxas de conversão e rendimentos. Operando em condições opostas a essas citadas, a cepa apresentava leitos mais estáveis e propícios à fermentação com altos rendimentos.

Capítulo 6

6 Sugestão para Trabalhos Futuros

- Adoção de um terceiro reator em série e/ou de um recipiente ao final dos dois reatores atuando como tanque decantador das células exclusas com reciclo aos biorreatores.
- Teste com a utilização de diferentes linhagens de levedura floculantes em diferentes reatores, exemplo primeiro reator operando com G1 e segundo reator com JU C4 1/00.
- A adoção de um ponto ótimo operacional para o teste com as cepas avaliadas.
- Modificação no sistema de biorreatores tubulares em série que permitam o trabalho com linhagens altamente floculantes (exemplo G1), levando assim uma maior concentração celular no leito formado por longos períodos de tempo.

Capítulo 7

7 Referências Bibliográficas

ALCARDE, V.E. Avaliação de parâmetros que afetam a flocculação de levedura e bactérias isoladas de processo industriais de fermentação alcoólica. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 91p., 2001.

ALMEIDA, J.R. Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinot. SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. Anais, Piracicaba, p. 254-262, 1960.

AMORIM, H.V. de; BASSO, L.C.; ALVES, D. M.G. Processo de Produção de Álcool – Controle e Monitoramento. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996.

ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica (II) contínua. Stab. Açúcar, Álcool, Álcool e subprodutos, v.9, p. 45-51, 1990.

ANDRIETTA, S.R. Otimização de processo de fermentação alcoólica em múltiplos estágios. Stab. Açúcar, Álcool, Álcool e Subprodutos, v. 10, n.2, p. 32-37, 1991.

ANDRIETTA, S.R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia de

Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 178 p., 1994.

ANDRIETTA, S.R. Seleção de leveduras floculantes para uso em reatores (tipo torre) fluidizados na produção de etanol. Campinas. Projeto Científico. Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA, Divisão de Biotecnologia e Processos, p. 2-15, 2004.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, A. J.; STHRUL, K. CURRENT. Protocols in Molecular Biology, Chapter 13. New York - USA, John Wiley & Sons Inc, 1998.

BENDIAK D. Yeast Flocculation by Absorbance Method. American Society of Brewing Chemists, Inc., v.53, p. 245-248, 1996.

BENDOVÁ, O.; RICHTER, H.V.; JANDEROVÁ, B.; HAÜSLER, J. Identification of industrial yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. Applied Microbiology and Biotechnology, v.35, p. 812-820, 1991.

BIDARD, F.; BONY M.; BLONDIN B.; DEQUIN S.; BARRE P. The *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 flocculation gene encodes a cell surface protein. Yeast, v.11, p. 809-822, 1995.

BOUIX, M.; LEVEAU, J.Y. Eletrophoretic study of the macromolecular compounds excreted by yeast: application to differentiation between strains of the same species. Biotechnology and Biong., v.25, p. 133-142, 1983.

BOULTON, R.B.; SINGLETON, V.L.; BISSON, L.F.; KUNKEE, R.E. Principles and Practices of Winemaking. New York: Chapman & Hall, 1996.

BRAVO, P.; GONZALEZ, G. Continuous Ethanol Fermentation by Immobilized Yeast Cell in a Fluidized-Bed Reactor. J. Chem. Tech. Biotechnology, v.52, p. 127-134, 1991.

BU'LUCK, J.D. Practical advantages of very flocculent yeast for alcohol production in single and multiple continuous systems. Int. Spec. Symp. Yeast. England, v. 8, a. 186, 1983.

CALLEJA, G.B. Cell Aggregation In The Yeast. Ed. A. H. Rose and J. S. Harrison, v.2, 2nd edn, p. 165-238. Academic Press, London, 1987.

CAMPBELL, I. Wild Yeast in Brewing and Distilling. In: PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. Brewing Microbiology. 2 ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999. Cap. 7, p. 193-208.

CARDINALI, G.; MARTINI, A. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. International Journal of Systematic Bacteriology, v.44, n.4, p. 791-797, 1994.

CASEY, G.P.; PRINGLE, A.T.; EDMANN, P.A. Evaluation of recent techniques used to identify individual strain of *Saccharomyces* yeast. American Society of Brewing Chemists, v.48, n.3, p. 100-106, 1990.

COSTA M. J.; MORADAS-FERREIRA P. S. *cerevisiae* flocculation: identification of specific cell wall proteins. Proc. Congr. Eur. Brew Conv. v.24, p. 283-290, 2001.

CYSEWSKY, G. R.; WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. Biotech. Bioeng. v.20, n.9, p. 1421-1444, 1978.

DEGRÉ, R.; THOMAS, D. Y.; ASH, J.; MAILHIOT, M.; MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. Am. J. Enil. Vitic., v.40, n.4, p. 309-315, 1989.

FERREIRA, O. C.; Avaliação preliminar do potencial de produção de etanol da cana de açúcar. n. 34, 2002. Disponível em http://ecen.com/eee34/limites_alcool.htm acesso em 17 fev. de 2007.

FINGUERUT, J.; CÉSAR, A. R. P.; LEINER, K. H.; VAZ ROSSEL, C.E. Fermentação continua em múltiplos estágios. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.10, n.3, p. 41-42, 1992.

GOMA, G.; RANAUD, P.Y.; CHAMILOTHORIS, G.; DAHHOU, B.; POURCIEL, J.B. Adaptive control of a multistage fermentation processes. Biotechnology and Bioengineering, v.35, p.217-223, 1990

GUANDALINI, G. & SILVA, C. A dupla conquista. Revista Veja. p.90-94, ed. 1941 de 1º de fevereiro de 2006.

GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em leveduras de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. Anais da ESALQ, v.47, p.597-608, 1990.

HARSHBARGER, D.; BAUTZ, M.; DAVISON, B.H.; SCOTT, T.C.; SCOTT, C.D. Economic assessment of ethanol production comparing traditional and fluidized bed bioreactors. Applied Biochemistry and Biotechnology. V.51, n.52, p. 593-604, 1995.

JIN, YU-LAI, SPEERS, A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Research International, v.31, n. 6-7, p. 421-440, 1999.

KAMADA, K. & MURATA, M. On the mechanism of brewers yeast flocculation. Agric. Biol. Chem., v.48, n.10, p. 2423-2433, 1984.

LINKO, Yu-Yen, JALANKA, Hannele, LINKO, P. Ethanol production from whey with immobilized living yeast. Biotechnology Letters, v.3, n.6, p.263-268, 1981.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Alcohol production and recovery. Advantages in biochemical engineering, v.20, p. 41-73, 1981.

MIANI, K.; DLAUCHY, D.; DEÁK, T. A comparative study of karyotyping, RAPD-PCR and nDNA/nDNA homology methods for identification of yeasts isolated from indian beverages. Acta Alimentaria, v.27, n.1, p. 43-52, 1998.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, n. 9, p 426 – 428, 1959.

MILLER, M.V. Yeasts. In: REED, G. Industrial Microbiology, Westport: AVI, p.15-43, 1983.

NAGASHIMA, M.; AZUMA, M.; NOGUCHI, S.; INUZUKA, K.; SAMEJINA, H. Continuous fermentation using immobilized yeast cells. Biotechnology Bioengineering. v.26, n.8, p.992-997, 1984.

NESS, F.; LAVALLÉE, F.; DUBOURDIEU, D.; AIGLE, M.; DULAU, L. Identification of yeast strain using the polymerase chain reaction. J. Sci. Food Agric., v.62, p.89-94, 1993.

NISHIHARA H.; MIYAKE K.; KAGEYAMA Y. Distinctly different characteristics of flocculation in yeast. J. Inst. Brew. v. 108, p.187-192.

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I factors affecting the type of metabolism. Biotechnology and Bioengineering, v.26, n.6, p.1197-1212, 1974.

PAIVA, T.C.B.; SATO, S.; VISCONTI A.E.S.; CASTRO, L.A.B.; Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.57, n.58, p.535-541, 1996.

PRINCE, I.; BARFORD, J. P. Continuous Tower fermentation for power ethanol production. *Biotechnology Letters*. v.4, n.4, p.263-268, 1982.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, v.15, n.3, p.439-446, 1992.

RODRIGUES, M.I.; ANDRIETTA, S.R.; MAUGERI FILHO, F. Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. *Stab. Açúcar, Álcool e Sub-produtos*, v.10, n.5, p.35-47, 1992.

RUSSEL, I.; JONES, R.; STEWART, G.G. Yeast – The primary industrial microorganism. *Biological Research on Industrial Yeasts*. Boca Ratón: CRC Press, p.2-4, 1987.

SALIK, F. L. M.; POVH, N.vP. (1993), Método electrofotométrico para a determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. *Anais do V Congresso Nacional da STAB*, Águas de São Pedro, p.262-266.

SATO M.; MAEBA H.; WATARI J.; TAKASHIO M. Analysis of an inactivated Lg-FLO1 gene present in bottom-fermenting yeast. *J. Biosci. Bioeng.* n.93, p.395–398.

SHINOHARA, T.; MAMIYA, S.; YANAGIDA, F. Introduction of flocculation property into wine yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) by hybridization. *J. Ferment. Bioeng.* n.83, p.96-101, 1997.

SOUZA, M.J.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromices marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, v.14, n.3, p.213-218, 1992.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. Campinas. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 215p, 2001.

STRATFORD M. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast*. v.5, p.487–496, 1989

STRATFORD, M. & BOND, C.J. Selective separation of microorganisms by lectins: yeast and concanavalin A as a model system. *Biotechnol. Bioeng.*, v.40, p.835-843, 1992.

STRAVER, M.H.; SMITH, G.; EN KIJNE, J.W. Induced cell surface hidrofobicity influences flocculation of brewer's yeast in a flocculation assay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.2, p.173-180, 1993.

TEUNISSEN A.; VAN DEN BERGH JA.; STEENSMA HY. Physical localization of the flocculation gene FLO1 on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* v.9, p.1–10, 1993.

TOLEDO, E.C.V. Modelagem, Simulação e Controle de Reatores Catalíticos de Leito Fixo. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia Química). Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas. 337p, 1999.

TOSETTO, G. Influência da matéria prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas. 118p., 2002.

TREDOUX, H.G.; KOCK, J.L.; LATEGAN, P.M.; MULLER, H.B. A rapid identification technique to differentiate between *Saccharomyces cerevisiae* strains

and other yeast species in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, v.38, p.161-164, 1987.

TSUCHIYA, T.; FUKUZAWA, Y.; KAWARITA, S. Significance of serological studies on yeasts. *Mycology Applicata*, v.26, p.1-5, 1965.

ÚNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). Produção Brasil – Álcool; Produção de álcool do Brasil das safras 1990/91 à 2005/06. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica/?secao=refer%EAnCIA> . Acesso em 17 de fevereiro de 2007.

VAN VUUREN, H.J.J.; VAN DER MEER, L.J. Characterization of brewing yeast strain by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Journal of the Institute of Brewing*, v.94, p.245-248, 1988.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast Flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.61, p.197-205, 2003.

VIEGAS, M.C. Desenvolvimento de um reator de bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras flocculantes. Dissertação (Mestre em Eng. Química). Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas. 86p, 1999.

VIEGAS, M.C.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. Utilização de Reatores Tipo Torre com Leveduras Auto-Imobilizáveis para Produção Contínua de Etanol. Apresentado no VII Seminar on Enzymatic Hidrolysis of Biomass – SHEB, Maringá, 2002.

VIEGAS, M.C. Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características flocculantes. Tese (Doutor em

Engenharia Química). Faculdade de Eng. Química. Universidade Estadual de Campinas, p.2-8, 2003.

WIECZOREK, A.; MICHALSKI, H. Continuous ethanol production by flocculating yeast in the fluidized bed bioreactor. FEMS Microbiology Reviews, v.14, p.69-74, 1994.

WATARI, J.; SATO, M.; OGAWA, M.; SHINOTSUKA, K. Genetic and physiological instability of brewing yeast. Eur. Brew. Conv. Monogr., v.28, p.148–160, 1999.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.N.; MACEDO, I.C., LAHR, D.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.84-86, p.1147-1161, 2000.

ZAPERLLON, F.; ANDRIETTA, S.R. Fermentação contínua para produção de álcool. STAB Açúcar Álcool e Subprodutos, v.10(4), p.23-28, 1992.

