

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção de etanol empregando leveduras convencionais e termotolerantes

Nayana Simon de Vargas

SÃO CARLOS-SP

2017

Produção de etanol empregando leveduras convencionais e termotolerantes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Produção de etanol empregando leveduras convencionais e termotolerantes

Nayana Simon de Vargas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves Cruz

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Lúcia G. C. Araújo

SÃO CARLOS-SP

2017

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE NAYANA SIMON DE VARGAS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 23 DE FEVEREIRO DE 2017.

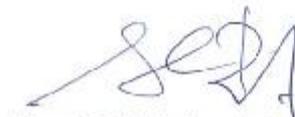
BANCA EXAMINADORA:



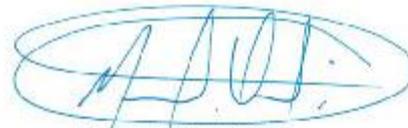
Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, UFSCar



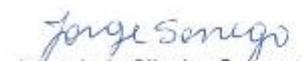
Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo
Coorientadora, UNESP



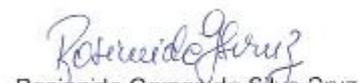
Alberto Colli Badino Junior
UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UNESP



Jorge Luiz Silveira Sonigo
UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
UFSCar

Agradecimentos

À Deus, por iluminar meu caminho e me acompanhar em todos os momentos.

À minha família, meu pai Jacinto, minha mãe Nadia, meus irmãos Natanael e João Afonso pelo amor incondicional, por abraçarem os meus sonhos e por se fazerem sempre presentes.

À família Simon e Vargas, pelas orações e apoio, em especial à minha Dinda Nara, meus avós maternos, Alírio e Helena, avós paternos, Derly e Horaydes e minha tia Dolores.

Aos meus amigos de infância, de faculdade, de estágio, de intercâmbio. Os verdadeiros laços sempre permanecem não importando o tempo nem a distância.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Antonio Cruz e Prof. Dra. Maria Lúcia Araújo, pela orientação, paciência e disponibilidade.

Aos Profs. Drs. Alberto Badino e Anderson Cunha, pelo suporte durante a realização deste trabalho.

Ao PPGEQ-UFSCar, pela estrutura e ensino de qualidade.

À FAPESP (Proc. 2012/50046-4), pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho e pela bolsa de estudos.

Aos meus colegas e amigos do PPGEQ-UFSCar pelo companheirismo, amizade e apoio.

Resumo

Para atender o crescimento do consumo, da exportação de etanol e cumprir com os compromissos estabelecidos na COP 21 (21ª Conferência do Clima) e no Protocolo de Quioto será necessário aumentar a produção de etanol nos próximos anos. Esse objetivo pode ser alcançado por meio do emprego de novas linhagens de levedura, de novas matérias-primas e de novas técnicas de extração. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus*, uma levedura termotolerante, e sua remoção por arraste empregando dióxido de carbono durante a fermentação (*stripping*). Experimentos foram realizados em frascos agitados na faixa de temperatura entre 36 a 44 °C com a levedura *K. marxianus* e na faixa de 34 e 40 °C com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem comercial e industrial) para comparar o desempenho de ambas leveduras. A levedura termotolerante foi avaliada em meio composto por caldo de sorgo sacaríneo e melão em experimento em frascos agitados a 40 °C. Experimentos realizados em biorreator (volume 2L) operado em modo batelada sem arraste e empregando arraste com dióxido de carbono (vazões específicas de 1,0, 1,5 e 2,5 vvm) foram realizados com a levedura *K. marxianus*. Em todos os experimentos foram calculados os parâmetros cinéticos e de rendimento. Realizou-se a modelagem matemática do processo empregando cinética de Levenspiel. O processo de *stripping* também foi modelado utilizando cinética de primeira ordem. Os parâmetros do modelo foram estimados por algoritmo genético. As fermentações a 40 °C com a levedura *K. marxianus* alcançaram desempenho dentro da faixa observada nas usinas brasileiras. O sorgo sacarino mostrou ser uma matéria-prima promissora e a levedura termotolerante foi capaz de consumir todos os açúcares presentes no meio de cultivo. Nos experimentos com *stripping* houve o aumento da produtividade volumétrica, sendo o maior valor obtido no experimento realizado a 1,0 vvm (9,02 g_E/L·h). O modelo matemático proposto forneceu uma descrição adequada dos processos fermentativos realizados.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; *Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces marxianus*; Arraste por dióxido de carbono; Modelagem matemática.

Abstract

To attend the increase in Brazilian ethanol consumption and exportation, and also to comply with the goals established in the COP 21 and Quioto protocol, it will be necessary to increase the ethanol production in the next years. This purpose can be achieved by using new yeast strains, new raw materials, and new extraction techniques. Thus, the objective of this work was to evaluate the ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*, a thermotolerant yeast, and its removal by carbon dioxide stripping throughout the fermentation. In this work, fermentation experiments were carried out in agitated flasks in temperature range from 36 to 44 °C using *K. marxianus* and in the range from 34 to 40 °C using *Saccharomyces cerevisiae* (commercial and industrial strains) to compare the performance of both yeasts. Thermotolerant yeast was evaluated using a medium composed by sweet sorghum and molasses in experiments carried out in agitated flasks at 40 °C. Assays with *K. marxianus* were carried out in a bioreactor (2 L) operated in batch mode and using carbon dioxide stripping (specific flow rates of 1.0, 1.5 and 2.5 vvm) . For all fermentation experiments the main kinetic parameters and yields were calculated. The fermentation process was modeled using Levenspiel kinetic. Stripping process was also modeled considering a first order kinetic. The model parameters were estimated by genetic optimization algorithm. Fermentations carried out at 40 °C with *K. marxianus* yeast exhibit a similar performance to that obtained in most Brazilian mills. Sweet sorghum demonstrated to be a promising raw material and the thermotolerant strain was able to consume all the sugars present in the broth. In the stripping experiments it was observed an increase in the value of the ethanol volumetric productivity. The higher value (9.02 g_E/L·h) was obtained in the experiment carried out at 1.0 vvm. The proposed mathematical model was able to adequately describe the fermentation processes.

Key-words: Ethanol Fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; *Kluyveromyces marxianus*; Carbon dioxide stripping; Mathematical modelling.

Lista de Figuras

Figura 1 - Conversão da biomassa em calor, energia elétrica e biocombustíveis.	4
Figura 2 - Produção mundial de etanol.....	6
Figura 3 - Extração do caldo de cana-de-açúcar: embebição composta com reciclo total.....	8
Figura 4 - Processo de destilação e retificação.....	12
Figura 5 - Tipos de sorgo: (a) granífero, (b) forrageiro, (c) sacarino e (d) vassoura.....	26
Figura 6 - Cronograma do plantio e colheita do sorgo e da cana-de-açúcar nas regiões centro-sul.	29
Figura 7 - Esquema das diferentes configurações do sistema de arraste gasoso.....	36
Figura 8 - Perfil da (a) concentração de etanol e de células, (b) vazão de alimentação e concentração de glicose e (c) concentração de glicose e de células - C_E (●), C_X (●), vazão de alimentação (●) e C_S (●).....	53
Figura 9 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> (▲) a 40 °C e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de <i>S. cerevisiae</i> a 34 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.	55
Figura 10 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> (▲) a 40 °C e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de <i>S. cerevisiae</i> a 34 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.....	56
Figura 11 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> (▲) e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de <i>S. cerevisiae</i> a 40 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.	57
Figura 12 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> (▲) e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de <i>S. cerevisiae</i> a 40 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.	58
Figura 13 - Viabilidades das linhagens industrial (verde), comercial (preto) e termotolerante (vermelho) durante os processos fermentativos com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio MF1 nas temperaturas de (a) 34 °C para as linhagens industrial e comercial, 40 °C para a termotolerante e (b) 40 °C para todas as linhagens.	62
Figura 14 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em processos fermentativos a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando como	

meio de fermentação sorgo (■), sorgo suplementado (●) e sorgo suplementado e melão (▲).
..... 64

Figura 15 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processos fermentativos a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando como meio de fermentação sorgo (■), sorgo suplementado (●) e sorgo suplementado e melão (▲).
..... 65

Figura 16 - Formação de etanol (círculo) e consumo de substrato (quadrado) pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processos fermentativos a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando como meio de fermentação o meio MSM (vermelho) e o MF1 (preto). 66

Figura 17 - Viabilidade da linhagem termotolerante de *K. marxianus* a 40 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, em meios compostos por sorgo sacarino (verde), sorgo sacarino suplementado (preto), sorgo sacarino com melão (vermelho) e o MF1 (azul)..... 69

Figura 18 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* nas temperaturas de 36 (■), 38 (●), 40 (▲), 42 (◆) e 44 °C (x) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1. 70

Figura 19 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* nas temperaturas de 36 (■), 38 (●), 40 (▲), 42 (◆) e 44 °C (x) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1. 71

Figura 20 - Crescimento celular (▲) e formação de etanol (●) durante processos de fermentação nas temperaturas de 36 °C (a), 38 °C (b), 40 °C (c), 42 °C (d) e 44 °C (e) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1..... 72

Figura 21 - Viabilidade da linhagem termotolerante durante processo fermentativo nas temperaturas de 36 (verde), 38 (preto), 40 (vermelho), 42 (azul) e 44 °C (amarelo) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1. 77

Figura 22 - Consumo de ART (●) e formação de etanol (▲) pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processo fermentativo em biorreator, a 40 °C, com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1. 78

Figura 23 - (a) Concentração de ART (quadrado) e de etanol (círculo), bem como (b) crescimento celular (triângulo) e formação de etanol nos ensaios fermentativos com *K. marxianus* a 40 °C em frascos agitados (preto) e em biorreator (vermelho) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio MF1..... 79

Figura 24 - Viabilidade da linhagem termotolerante durante processo fermentativo a 40 °C em frascos agitados (preto) e em biorreator (vermelho) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1..... 82

Figura 25 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em ensaios de fermentação no modo batelada convencional (■) e batelada com arraste de etanol com vazão específica de gás de 2,5 (●), 1,5 (▲) e 1,0 vvm (◆) a partir da 3ª hora do início do experimento.	83
Figura 26 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em ensaios de fermentação no modo batelada convencional (■) e batelada com arraste de etanol com vazão específica de gás de 2,5 (●), 1,5 (▲) e 1,0 vvm (◆) a partir da 3ª hora do início do experimento..	84
Figura 27 - Viabilidade da linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> durante processo fermentativo no modo batelada convencional (verde) e com arraste de etanol com vazão específica de gás de 2,5 (preto), 1,5 (vermelho) e 1 vvm (azul).	88
Figura 28 - Valores de C_S (preto), C_E (verde) e C_X (vermelho) experimentais e simulados das fermentações em frascos agitados utilizando a linhagem de <i>K. marxianus</i> nas temperaturas de (a) 36, (b) 38, (c) 40, (d) 42 e (e) 44 °C. Linhas são os valores simulados e símbolos os valores experimentais.....	89
Figura 29 - Valores de C_S (preto), C_E (verde) e C_X (vermelho) experimentais e simulados da fermentação em biorreator a 40 °C utilizando a linhagem de <i>K. marxianus</i> . Linhas são os valores simulados e símbolos os valores experimentais.	92
Figura 30 - Valores de C_S (preto), C_E (verde) e C_X (vermelho) experimentais e simulados das fermentações com arraste de etanol nas vazões específicas de CO_2 de (a) 2,5, (b)1,5 e (b) 1 vvm. Linhas são os valores simulados e símbolos os valores experimentais.	94
Figura 31 - Identificação da linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i>	110

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos biocombustíveis com base na tecnologia adotada na sua produção.	5
Tabela 2 - Parâmetros operacionais obtidos em cultivos em frascos agitados utilizando leveduras termotolerantes e convencional.	22
Tabela 3 - Concentração de etanol e produtividade volumétrica obtidos em diferentes temperaturas utilizando linhagem de <i>S. cerevisiae</i> termotolerante e industrial.	23
Tabela 4 - Dados do processo de produção de etanol em biorreator utilizando caldo de sorgo sacarino e leveduras termotolerante e industrial.	24
Tabela 5 - Parâmetros operacionais obtidos em cultivos de diferentes cepas da levedura <i>K. marxianus</i>	24
Tabela 6 - Parâmetros de desempenho do sorgo sacarino como matéria-prima para produção de etanol em comparação com a cana-de-açúcar.	28
Tabela 7 - Desempenho do sorgo sacarino como matéria-prima para produção de etanol em comparação com o milho.	28
Tabela 8 - Características agrônomicas do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar.	30
Tabela 9 - Características da fibra do bagaço do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar.	31
Tabela 10 - Características do caldo extraído do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar.	31
Tabela 11 - Comparação entre ART, teor alcóolico e rendimento na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e do sorgo.	32
Tabela 12 - Dados da fermentação empregando caldos de sorgo, de cana-de-açúcar e misturas de ambas matérias-primas.	33
Tabela 13 - Composição dos meios de crescimento, ativação e fermentação.	42
Tabela 14 - Principais condições dos ensaios de fermentação realizados.	45
Tabela 15 - Valores de k_E e k_A empregados nas simulações dos processos com arraste de etanol por CO_2	51
Tabela 16 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> e linhagens convencionais de <i>S. cerevisiae</i> com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.	59

Tabela 17 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> e linhagens convencionais de <i>S. cerevisiae</i> com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.....	61
Tabela 18 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, em diferentes meios de fermentação.	67
Tabela 19 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, em diferentes meios de fermentação.....	68
Tabela 20 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em diferentes temperaturas com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.	74
Tabela 21 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em diferentes temperaturas com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.....	76
Tabela 22 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos a 40 °C empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em frascos agitados e em biorreator com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.	80
Tabela 23 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos a 40 °C empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> em frascos agitados e em biorreator com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.....	81
Tabela 24 - Coeficientes de rendimento, velocidade específica máxima de crescimento celular, concentrações de etanol e produtividades em etanol dos processos fermentativos no modo batelada e batelada com arraste de etanol, empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i>	85
Tabela 25 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos no modo batelada convencional e batelada com arraste de etanol, empregando linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i>	87
Tabela 26 - Parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel dos ensaios em frascos agitados.	91
Tabela 27 - Parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel do ensaio realizado em frascos agitados e em biorreator.	93

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Objetivos.....	2
1.1.1	Objetivo geral.....	2
1.1.2	Objetivos específicos.....	3
2	Revisão Bibliográfica.....	4
2.1	Biocombustíveis: cenário e classificação.....	4
2.2	Etanol de primeira geração (matéria-prima açucarada).....	6
2.2.1	Fermentação e fatores que afetam o processo fermentativo.....	13
2.3	Leveduras termotolerantes.....	18
2.4	Sorgo sacarino como matéria-prima para produção de etanol.....	26
2.4.1	Sorgo sacarino no cenário brasileiro: complemento da produção de etanol da cana-de-açúcar.....	29
2.5	Processos de extração de etanol por arraste gasoso.....	34
3	Materiais e Métodos.....	41
3.1	Materiais.....	41
3.2	Métodos.....	43
3.2.1	Métodos experimentais.....	43
3.2.2	Métodos de análise.....	46
3.2.3	Métodos de cálculo.....	48
4	Resultados e Discussão.....	52
4.1	Preparo da cultura estoque da linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i>	52
4.2	Ensaio de fermentação em frascos agitados.....	54
4.2.1	Comparação entre o desempenho da linhagem termotolerante de <i>K. marxianus</i> e de linhagens convencionais de <i>S. cerevisiae</i>	54
4.2.2	Análise de diferentes meios de fermentação.....	63
4.2.3	Análise da temperatura ótima de fermentação da linhagem termotolerante.....	70
4.3	Ensaio de fermentação em biorreator.....	78
4.3.1	Ensaio de fermentação em biorreator no modo batelada convencional.....	78
4.3.2	Ensaio de fermentação em biorreator no modo batelada com arraste de etanol por CO ₂	82
4.4	Simulação e ajuste dos parâmetros do modelo cinético.....	88
4.4.1	Simulação e ajuste dos parâmetros do modelo das fermentações realizadas em frascos agitados que avaliaram a temperatura ótima de fermentação da linhagem de <i>K. marxianus</i>	89

4.4.2 Simulação e ajuste dos parâmetros do modelo da fermentação realizada em biorreator no modo batelada convencional	92
4.4.3 Simulação dos ensaio de fermentação realizados em biorreator no modo batelada com arraste de etanol por CO ₂	93
5 Conclusões.....	96
6 Sugestões para trabalhos futuros	98
7 Referências bibliográficas	99
APÊNDICE	110

1 Introdução

O etanol é o biocombustível mais utilizado no mundo e o processo de produção de etanol de primeira geração no Brasil já está bem estabelecido, com os menores custos e a maior produtividade do mundo (PACHECO, 2011). Entretanto, nos próximos anos haverá a necessidade de se aumentar a produção deste biocombustível para atender o crescimento do consumo e da exportação (FIESP, 2013), bem como para honrar com os compromissos assumidos pelo Brasil na 21^a Conferência do Clima (COP 21) (ÚNICA, 2015) e no Protocolo de Quioto (MAPA, 2012). Para tal, pode-se recorrer tanto ao aperfeiçoamento das tecnologias para produção de etanol de primeira geração (1G), quanto ao desenvolvimento científico e tecnológico para produção de etanol de segunda geração (2G). Em se tratando da produção de etanol 1G, pode-se citar como maneiras de aumentar a produtividade do processo, a seleção de novas linhagens de levedura, o desenvolvimento de tecnologias de extração de etanol que minimizem o efeito inibitório do metabolismo celular, a racionalização do uso de água (PACHECO, 2011) e a introdução de novas matérias-primas capazes de aumentar os níveis de produção (PACHECO^b, 2012).

Com relação à seleção de novas linhagens, destaca-se o uso de leveduras termotolerantes, que são capazes de manter o seu metabolismo à temperatura igual ou superior a 40 °C (BANAT *et al.*, 1998). Estas leveduras ganham especial atenção em locais de clima quente, pois manter a temperatura ótima de fermentação pode se tornar caro ou inviável (HACKING *et al.*, 1984). As leveduras termotolerantes podem ainda proporcionar economia de energia, devido à redução nos gastos com resfriamento dos reatores (KUMAR^a *et al.*, 2013), aumento da produtividade (altas taxas de consumo de substrato e de formação de produto) (EIADPUM *et al.*, 2012), possibilidade de se utilizar o processo de arraste gasoso como método para extração de etanol (BANAT *et al.*, 1998) e restrição nas chances de contaminação por microrganismos mesófilos, como *Williopsis sp.*, *Candida sp.*, *Zygosaccharomyces sp.* (NUANPENG *et al.*, 2016). Dentre as linhagens termotolerantes, a *Kluyveromyces marxianus* oferece como vantagens a alta velocidade de crescimento celular e a habilidade de utilizar uma vasta gama de substratos, tais como: caldo de cana-de-açúcar, água de maceração de milho, melaço, soro de leite (RADECKA *et al.*, 2015), substratos compostos por xilose, xilitol, celobiose, entres outros (NONKLANG *et al.*, 2008).

No que se refere à possibilidade de se introduzir novas matérias-primas para aumentar a produtividade do processo de produção de etanol 1G, coloca-se em evidência o

sorgo sacarino. Esta espécie possui colmos ricos em açúcares fermentescíveis, é uma cultura de ciclo rápido de crescimento (quatro meses) e é totalmente mecanizável (plantio por sementes, tratamentos culturais e colheita) (DURÃES, 2011). Estudos recentes demonstraram que o desempenho do sorgo pode ser comparado com o das duas matérias-primas mais utilizadas na produção de etanol, cana-de-açúcar (FERNANDES *et al.*, 2014) e milho (VLACHOS, *et al.*, 2014). No Brasil, a possível utilização desta matéria-prima tem como objetivo complementar a produção de etanol durante a entressafra da cana-de-açúcar, reduzindo o período de ociosidade das destilarias (DURÃES, 2011). Mas em países como Índia e China, o sorgo se destaca principalmente pelas suas características agrônômicas, pois esta espécie é eficiente no uso da água e de insumos e apresenta bom desenvolvimento em diferentes tipos de clima e solo (MAGALHÃES *et al.*, 2007; RIBAS, 2007; PURCINO, 2011; FERREIRA, 2012).

A produtividade do processo fermentativo está fortemente atrelada ao metabolismo celular. Dentre os fatores que podem influenciar a produção de etanol, tem-se a inibição do metabolismo celular pela presença deste produto em altas concentrações. Uma forma de minimizar este efeito é através do uso de técnicas de remoção de etanol do meio fermentativo, tais como: arraste gasoso, vácuo, pervaporação, extração líquido-líquido e adsorção. A remoção de etanol pela técnica do arraste gasoso apresenta como vantagens a sua relativa simplicidade, a opção de se utilizar o dióxido de carbono produzido durante a fermentação como gás de arraste (VANE, 2008), baixo custo de operação, não há risco de se ter problemas de incrustação ou entupimento, como na técnica de pervaporação (PONCE, 2015), não remove nutrientes nem as células do meio (PARK E GENG, 1992) e é possível utilizar a mesma temperatura do fermentador (VANE, 2008).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Baseado no que foi exposto, o objetivo geral desta dissertação de mestrado foi avaliar o desempenho fermentativo de uma linhagem da levedura *Kluyveromyces marxianus* isolada de uma unidade industrial de produção de etanol.

1.1.2 Objetivos específicos

Para a concretização do objetivo geral, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

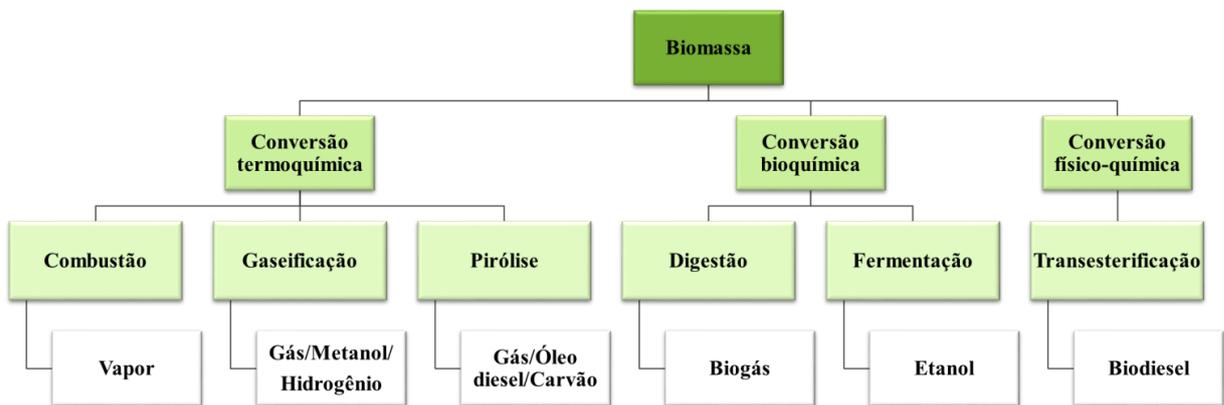
- implementação de protocolo de propagação da levedura *K. marxianus* em biorreator de bancada a 40 °C;
- ensaios de fermentação em frascos agitados para comparação do desempenho fermentativo da levedura *K. marxianus* a 40 °C com o de linhagens da levedura *Saccharomyces cerevesiae*, comercial (AB Brasil, Pederneiras, SP) e industrial (Y-904), a 34 e 40 °C;
- ensaios de fermentação em frascos agitados para avaliação do comportamento da levedura *K. marxianus* em diferentes meios fermentativos compostos por misturas de sorgo sacarino e melão;
- ensaios de fermentação em frascos agitados para avaliação do comportamento da levedura *K. marxianus* na faixa de temperatura de 36-44 °C;
- ensaios de fermentação com a linhagem de *K. marxianus* em biorreator operado no modo batelada (fermentação convencional) e batelada com arraste de etanol por dióxido de carbono (fermentação extrativa);
- modelagem e simulação dos processos fermentativos em frascos agitados em diferentes temperaturas e em biorreator empregando modelo cinético híbrido Monod-Levenspiel.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Biocombustíveis: cenário e classificação

O termo bioenergia refere-se a energia derivada da conversão de biomassas. Biomassa é toda matéria orgânica derivada de plantas ou animais, que pode ser decomposta e está disponível de forma renovável, como por exemplo: madeira, resíduos orgânicos e culturas agrícolas (IEA, 2015). Como produtos gerados a partir da conversão dessas matérias-primas estão os biocombustíveis, utilizados no transporte (etanol e biodiesel) e produtos utilizados na geração de energia elétrica (vapor e gases) e calor (vapor). Na Figura 1, ilustram-se as rotas tecnológicas de conversão de biomassas.

Figura 1 - Conversão da biomassa em calor, energia elétrica e biocombustíveis.



Fonte: adaptado de Turkenburg (2000).

De acordo com dados da IEA (International Energy Agency), em 2014 a produção mundial de petróleo foi de 31%, a de carvão 29%, de gás natural 21%, de biocombustíveis 10% e 9% de outras fontes (hidro, nuclear, geotérmica e calor). Quanto ao setor de transporte, 92% do combustível consumido foi proveniente de derivados do petróleo, 4% de gás natural, 3% de biocombustíveis, 1% de eletricidade e 0,1% de carvão.

Dentre os produtos gerados a partir do processamento de biomassas, os biocombustíveis apresentam-se como uma alternativa viável à substituição do petróleo, pois podem ser produzidos em larga escala, são de origem renovável, sua utilização diminuiria a dependência pelas fontes fósseis, reduziria impactos ambientais decorrentes da extração e utilização de combustíveis derivados do petróleo, além de proporcionar segurança no

fornecimento de combustíveis, uma vez que muitas reservas estão localizadas em regiões politicamente instáveis (DALE, 2008).

Os biocombustíveis podem ser produzidos no estado líquido (etanol e biodiesel), gasoso (biogás) ou sólido (lenha e carvão). De acordo com a necessidade de processamento podem ser classificados como primários ou secundários. Os biocombustíveis primários (madeira) não precisam ser processados e são utilizados para aquecimento, cozimento ou para produção de eletricidade, enquanto que os secundários (etanol e biodiesel) são obtidos através do processamento de biomassas e são empregados na indústria e em veículos (NIGAM e SINGH, 2011).

Com base na matéria-prima e na tecnologia adotada no processamento da biomassa, os biocombustíveis podem ser classificados como de primeira, segunda, terceira ou quarta geração. Na Tabela 1 pode-se conferir a matéria-prima utilizada e o produto obtido em cada geração.

Tabela 1 - Classificação dos biocombustíveis com base na tecnologia adotada na sua produção.

Geração	Principais matérias-primas	Exemplos
Primeira geração	Culturas alimentares: sementes oleaginosas, milho (matéria-prima amilácea) e cana-de-açúcar (matéria-prima açucarada)	Etanol, biodiesel e biogás
Segunda geração	Matérias-primas lignocelulósicas: resíduos agrícolas (palhas de cereais, bagaço da cana) e florestais	Etanol, biodiesel, biometanol e biohidrogênio
Terceira geração	Algas	Etanol, biodiesel, biohidrogênio e biometano
Quarta geração	Algas com metabolismo modificado	Etanol, biodiesel, biohidrogênio e biometano

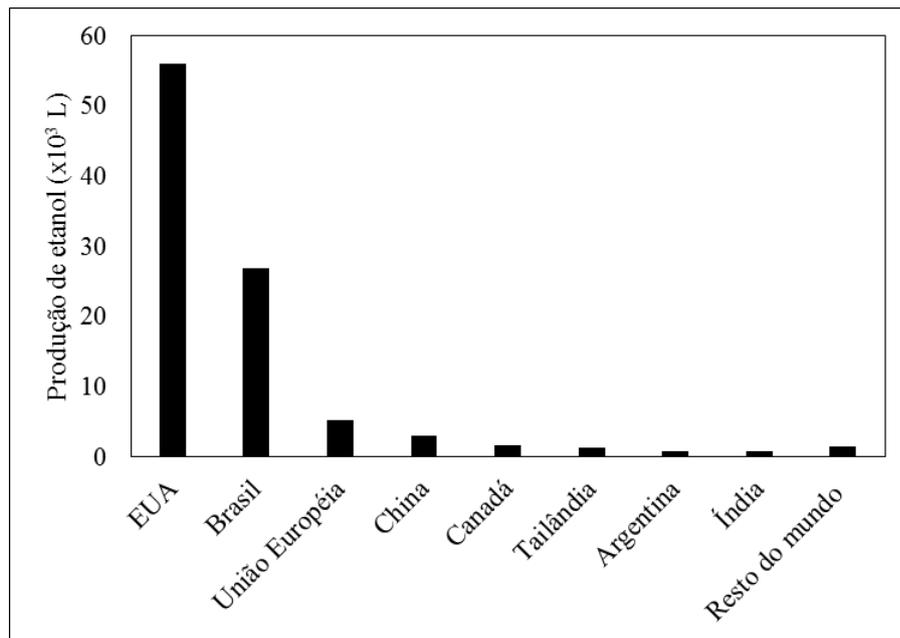
Fonte: Unep (2009); Lu^a *et al.* (2011); Oncel (2013).

O etanol é o biocombustível mais utilizado no mundo e os pioneiros na produção em larga escala foram o Brasil e os Estados Unidos. No Brasil, o primeiro incentivo governamental para produção de etanol começou em 1933, com a criação do Instituto do Açúcar

e do Álcool e pela criação da Lei nº 737, que tornou obrigatória a mistura de etanol na gasolina. Em 1975, com o objetivo de reduzir a dependência do Brasil em relação ao petróleo importado, o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) foi lançado (LEITE e CORTEZ, 2007). Já os Estados Unidos começaram a incentivar a produção de etanol em 1975 pela publicação do *National Energy Policy Conservation Act* (US CONGRESS, 1978; TYNER, 2007) em resposta à crise do petróleo de 1973.

Atualmente os maiores produtores de etanol são os EUA, Brasil, Europa, China e Canadá (RFA, 2015). Como matéria-prima, os EUA utilizam o milho; o Brasil, a cana-de-açúcar; a Europa, o trigo e a beterraba; a China, o milho, trigo e a mandioca, enquanto que no Canadá, destaca-se a produção de etanol a partir do milho e do trigo (GUO *et al.*, 2014). Na Figura 2, ilustram-se os dados da produção mundial deste biocombustível no ano de 2015.

Figura 2 - Produção mundial de etanol.



Fonte: adaptado de relatório da RFA-Renewable fuels association (2015).

2.2 Etanol de primeira geração (matéria-prima açucarada)

Como apresentado na Tabela 1, existem diferentes gerações de biocombustíveis e de matérias-primas que podem ser processadas para obtenção de etanol. A adoção de uma matéria-prima depende de vários fatores, tais como: disponibilidade, facilidade de transporte, de estoque e de obtenção, rendimento em etanol, custo do pré-tratamento e do processamento (VASCONCELOS, 2015). Industrialmente destaca-se a produção de etanol de primeira geração

a partir da cana-de-açúcar e do milho, pois o processo industrial das outras gerações ainda está em desenvolvimento, como é o caso do etanol de segunda geração no Brasil (UNICA, 2015).

O etanol de primeira geração pode ser produzido a partir de matérias-primas açucaradas (cana-de-açúcar, beterraba e sorgo sacarino) e amiláceas (milho, trigo e mandioca). Independente da biomassa, açucarada ou amilácea, o processo de produção de etanol, consiste basicamente nas seguintes etapas: tratamento da biomassa para obtenção de uma solução açucarada, uso de leveduras ou bactérias para conversão do açúcar em etanol e CO₂ (fermentação), separação do etanol do caldo fermentado (destilação) e se necessário, desidratação do etanol (BARISANO *et al.*, 2011).

Dando ênfase às matérias-primas açucaradas e à produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, tendo como modelo o Brasil, pode-se dividir o processo nas seguintes etapas: recepção, preparo e moagem da matéria-prima, tratamento e concentração do caldo, preparo do mosto, fermentação, destilação e retificação.

1) Recepção, preparo e moagem

Ao chegar na usina, a matéria-prima é pesada e analisada com o intuito de quantificar a cana que está entrando no processo e obter indicadores de qualidade (pol, Brix, ART e fibras). No caso de excesso de matéria-prima a recomendação é que a cana seja estocada por no máximo 2 dias, pois pode ocorrer o ressecamento dos colmos, inversão da sacarose em glicose e frutose e contaminações por bactérias, fungos ou leveduras selvagens (TONON, 2013).

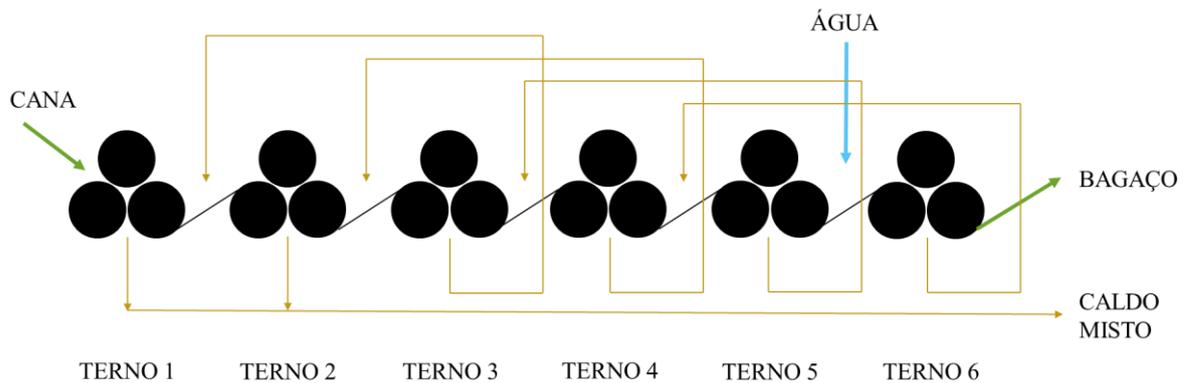
A primeira etapa do preparo da cana para processamento é a lavagem, que pode ser realizada a seco ou com água. Nesta etapa remove-se materiais como areia, argila, palha e pedras (TONON, 2013).

Após lavagem, a cana passa por picadores, desfibradores e espalhadores, que uniformizam o material. Estes equipamentos preparam a cana para a moagem e embebição, rompendo os nós existentes entre os colmos, aumentando a densidade do material e tornando o esmagamento mais eficiente, pois a massa torna-se compacta e uniforme. A partir desta etapa ganha-se em rendimento no processo de extração de sacarose e na capacidade de moagem (TONON, 2013).

Pronta para a extração a cana segue para a moenda. A moenda é geralmente composta por 4 a 7 ternos em série. Após o primeiro terno a proporção de caldo em relação a fibra fica muito pequena, tornando-se difícil a extração de mais caldo. Para contornar este

problema, utiliza-se a embebição (LEITE *et al.*, 2009). Este processo pode ser do tipo simples, composto com reciclo (total ou parcial) ou misto (CAMARGO *et al.*, 1990), sendo o tipo composto o mais utilizado. Neste, água é injetada na camada de cana entre os dois últimos ternos e o caldo de cada terno é injetado antes do terno anterior até o segundo terno (LEITE *et al.*, 2009). Na Figura 3, apresenta-se um fluxograma ilustrativo do processo de embebição do tipo composto.

Figura 3 - Extração do caldo de cana-de-açúcar: embebição composta com reciclo total.



Fonte: adaptado de Camargo *et al.* (1990).

Após a extração na moenda, o caldo segue para a etapa de tratamento e o bagaço é enviado para as caldeiras (LEITE *et al.*, 2009).

2) Tratamento do caldo

O caldo extraído na moenda ainda contém impurezas, como fibras, coloides, terra, areia e argila, que devem ser removidos para que não interfiram no rendimento das etapas seguintes (LEITE *et al.*, 2009)

A primeira etapa do tratamento consiste no peneiramento do caldo em peneiras rotativas com o objetivo de remover os bagacilhos (resíduo do bagaço). O caldo peneirado segue para o tratamento e os bagacilhos retornam para a moenda (TONON, 2013).

Após peneiramento, o caldo passa por esterilização a 105 °C, resfriamento (para evitar alterações na composição do caldo), floculação e decantação. A partir da decantação tem-se o caldo clarificado e o lodo. O caldo clarificado segue no processo e o lodo é filtrado e misturado com o bagacilho. O caldo remanescente da filtração volta para o processo de tratamento e a torta é utilizada como adubo agrícola (TONON, 2013).

3) Concentração do caldo, preparo do mosto e inóculo

Para se otimizar o processo de fermentação e destilação o caldo deve conter aproximadamente 20 °Brix, caso contrário, pode-se efetuar um processo de evaporação e/ou adicionar melaço, produto proveniente da fábrica de açúcar e que contém aproximadamente 88 °Brix. No caso de concentração do caldo por evaporação, este deve ser resfriado até uma temperatura de 32-35 °C, faixa ideal para a fermentação (TONON, 2013).

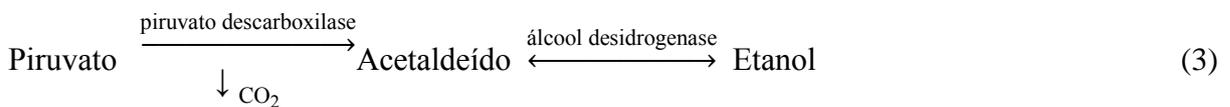
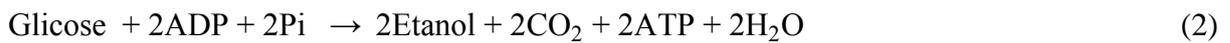
Até meados da década de 90 iniciava-se a safra com leveduras oriundas da indústria de panificação. Contudo, notou-se que estas leveduras eram completamente substituídas por leveduras nativas ainda no início da safra (BASSO *et al.*, 1993). Assim, as usinas começaram a propagar a sua própria levedura para o início da safra. Hoje em dia, unidades produtoras de biomassa fornecem grandes volumes de leveduras isoladas de usinas brasileiras, que são utilizadas como inóculo não só para as unidades das quais foram isoladas, mas também para outras unidades. Tais leveduras foram nomeadas com as iniciais das usinas de origem, como por exemplo, levedura isolada da Usina Barra Grande, BG1, da Usina Cresciumal, CR1, da Usina Santa Adélia, SA1, da Usina Catanduva, CAT1 e da Usina da Pedra, PE1, PE2, entre outras (ANDRIETTA *et al.*, 2006).

4) Fermentação

A fermentação é um termo geral para a degradação da glicose ou de outros nutrientes orgânicos (NELSON e COX, 2008). Esta degradação se dá por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas, como produto final dessas reações tem-se o piruvato, que pode ser catabolizado por uma de três rotas possíveis. Na primeira rota, em condições aeróbias e por meio do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), o piruvato pode ser convertido a CO₂ e H₂O, metabolismo típico de plantas, animais e células microbianas. Na segunda rota, o piruvato é convertido em lactato via fermentação do ácido láctico, característico do metabolismo de alguns tecidos e células, como eritrócitos. E por fim, na terceira rota, o piruvato é convertido a etanol e CO₂ em um processo denominado de fermentação alcoólica, metabolismo típico de leveduras (NELSON e COX, 2008).

No caso da fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar que é rico em sacarose, primeiro ocorre o desdobramento desta substância em outras que são diretamente fermentescíveis, como a glicose e a frutose. Este desdobramento ocorre por meio de uma reação catalisada pela enzima invertase (Equação 1) (CAMARGO *et al.*, 1990). Após, o piruvato é convertido a etanol e CO₂ em duas etapas, primeiro ele é descarboxilado em uma reação

irreversível catalisada pela piruvato-descarboxilase e forma uma molécula de acetaldeído, que na segunda etapa é reduzida a etanol pela enzima álcool desidrogenase (NELSON e COX, 2008). A Equação 2 representa a reação global da fermentação e a Equação 3, a transformação do piruvato em etanol e CO₂.



O rendimento teórico da Equação 2 em termos de crescimento celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) é de 0,12 g_{células}/g_{glicose}. Já em termos de produção de etanol o rendimento teórico é de 0,51 g_{etanol}/g_{glicose} ou 0,54 g_{etanol}/g_{sacarose} (PACHECO^a, 2012). Na prática, o rendimento em etanol alcançado é de aproximadamente 90-95% do valor teórico (BADINO e CRUZ, 2012), pois além de etanol, a glicose é convertida em células e outros compostos, tais como: glicerina, ácido succínico, álcoois amílico, isoamílico, butílico e outros (CAMARGO *et al.*, 1990).

No que concerne ao processo industrial, a fermentação ocorre em dornas, fechadas, com fundo cônico e o controle de temperatura é realizado por meio de sistema de resfriamento. No topo das dornas há captação do CO₂ gerado, que passa por lavagem com água em contra-corrente para recuperação do etanol que sai por arraste (TONON, 2013).

O processo fermentativo pode ser realizado em diferentes modos de operação, tais como: batelada, batelada alimentada e de forma contínua. O modo de operação em batelada começa com a propagação das leveduras em condições aeróbias, com o objetivo de se alcançar a concentração de células apropriada para o processo fermentativo. Após a propagação, as leveduras são inoculadas e o processo se inicia de modo anaeróbio. A principal desvantagem deste processo consiste nos custos operacionais e de matéria-prima necessários para garantir as taxas de produção de etanol e de crescimento celular a cada batelada, pois neste modo as leveduras não são reutilizadas e é necessário lavar e esterilizar os equipamentos e o meio, bem como inocular as leveduras, carregar e descarregar o reator a cada ciclo (CARDONA *et al.*, 2010).

No modo batelada alimentada, o biorreator é preenchido com 25-30% de solução contendo a levedura (conhecido na usina como “pé-de-cuba”). Em seguida, meio fresco (mosto) é adicionado à dorna até atingir seu volume útil (TONON, 2013). A vazão de adição de meio pode ocorrer de forma linear ou seguindo alguma função mais complexa (CARDONA *et al.*, 2010). Após o enchimento do biorreator, a alimentação cessa e o processo segue no modo batelada (TONON, 2013). Este modo de operação é vantajoso pois os efeitos inibitórios causados pelas altas concentrações de substrato e pelo aumento da concentração de etanol no meio fermentativo são neutralizados devido ao controle da taxa de alimentação de meio na etapa de enchimento do biorreator (CARDONA *et al.*, 2010).

Por fim, na operação em modo contínuo a adição de meio fresco e a retirada do meio fermentado são realizados simultaneamente, fazendo com que o processo ocorra em regime permanente. Os microrganismos devem se reproduzir a uma taxa de crescimento que compense a remoção de células que ocorre com a retirada do meio fermentado, mantendo o estado estacionário (CARDONA *et al.*, 2010). Processos contínuos possuem uma série de vantagens em relação ao modo batelada alimentada devido ao custo reduzido para construção dos biorreatores, baixa manutenção, operação simples, melhor controle do processo, alta produtividade (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008) e redução do efeito inibitório que ocorre pela remoção de etanol na corrente efluente. A maior desvantagem está no fato das leveduras terem sua capacidade de produção de etanol reduzida devido a operação por longos períodos. Além disso, altas taxas de diluição (proporcional à adição de meio e remoção de efluente) impedem o completo consumo do substrato diminuindo os rendimentos (CARDONA *et al.*, 2010).

O modo de operação mais comum nas usinas brasileiras é o modo batelada alimentada com tratamento e reciclo de células. Este processo de reaproveitamento das leveduras denomina-se *Melle-Boinot*. A separação das células do vinho, após a fermentação, se dá por meio de centrifugação, sendo que a porção correspondente ao vinho segue para destilação e as leveduras passam por um tratamento, que consiste em diluição em água e adição de ácido sulfúrico para ajuste do pH. Após cerca de 3 horas as leveduras retornam para o processo (CAMARGO *et al.*, 1990).

5) Destilação e retificação

Após os processos de purificação pode-se obter dois tipos de etanol: etanol hidratado, com pureza de 92,6-93,8° INPM que é utilizado como combustível e o etanol anidro,

A retificadora é composta pela seção de exaustão (B1) e de concentração (B). A coluna B1 é aquecida por meio dos vapores de exaustão ou com injeção de vapor de forma suficiente a esgotar o líquido e formar o produto de fundo, a flegmaça, que contém menos de 0,03% em volume de etanol. Na seção de concentração (B), os vapores vão se enriquecendo gradualmente em etanol até alcançarem o topo da coluna e serem condensados (E, E1 e E2), parte desses vapores retornam para o processo e parte são removidos como etanol de segunda. O etanol hidratado é removido 4 pratos abaixo do topo da coluna para reduzir risco de contaminação por impurezas voláteis. Após, o etanol hidratado passa pelo trocador de calor J (etanol-água) para resfriamento até 33°C, para em seguida ser estocado (BARRETO e COELHO, 2015).

O etanol hidratado é uma mistura azeotrópica de etanol e água, portanto para obtenção do etanol anidro é necessário utilizar um processo de desidratação. Como opções de processos de desidratação tem-se a destilação azeotrópica, a destilação extrativa ou o peneiramento molecular (BARRETO e COELHO, 2015). Dentre esses processos destaca-se o peneiramento molecular que tem como vantagem o baixo consumo de vapor por litro de etanol. Como segunda opção o processo de absorção com monoetilenoglicol está amplamente difundido e aprovado. A respeito da destilação azeotrópica, desde que reformulada para otimização do consumo de vapor de aquecimento, pode ser uma alternativa como processo de desidratação (LEITE *et al.*, 2009).

A fermentação é o processo central na produção de etanol, pois é nesta etapa que ocorre a transformação da matéria-prima tratada em etanol através do metabolismo de bioagentes (CARDONA *et al.*, 2010). Portanto, os fatores que influenciam o rendimento desta etapa serão discutidos no próximo subitem.

2.2.1 Fermentação e fatores que afetam o processo fermentativo

Vários fatores podem influenciar o rendimento do processo fermentativo, dentre estes destacam-se o microrganismo selecionado, as concentrações de célula, de açúcares e de etanol, os nutrientes, a temperatura, a agitação e o pH (VASCONCELOS, 2015).

1) Microorganismo

A produção de etanol é consequência do metabolismo de microrganismos como leveduras e bactérias, porém, industrialmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é predominantemente empregada nos processos de fermentação das usinas brasileiras, tanto linhagens industriais, quanto linhagens selvagens (FERMENTEC, 2015). Tal predominância é justificada pelo fato deste microrganismo possuir todas as características desejadas para a condução de um processo fermentativo, tais como: rapidez na transformação de açúcares em etanol, alta tolerância à etanol, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, atividade celular em ambiente ácido (ANDRIETTA *et al.*, 2006) e por estar naturalmente presente no caldo de cana (ANDRIETTA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011).

As leveduras são heterotróficas, unicelulares, se reproduzem por esporulação e são abundantes na natureza, podendo ser encontradas no solo, em frutas, dentre outros. Dependendo do lugar onde as culturas se estabelecem, as leveduras podem apresentar diferentes dimensões, com formas que podem variar de ovoide a esférico ou elipsoidal e podem crescer de forma isolada, em pares ou em pequenas cadeias (VASCONCELOS, 2015).

Com relação ao metabolismo, estes microrganismos fermentam em condições anaeróbias, com baixa formação de biomassa e alta produção etanol, sendo que o oposto ocorre na presença de oxigênio, este é o efeito *Pasteur* (VASCONCELOS, 2015). Contudo, leveduras, como as da espécie *S. cerevisiae*, sofrem o efeito de *Crabtree*, que faz com que a fermentação alcoólica seja a via predominante na degradação dos açúcares mesmo na presença de oxigênio, devido a insuficiente capacidade, saturação ou repressão do metabolismo respiratório ocasionando no *overflow* do piruvato (PISKUR, 2006). Após degradação dos açúcares e acúmulo de etanol, as leveduras podem passar a apresentar um comportamento diauxico, ou seja, o produto da fermentação passa a ser substrato (PRONK *et al.*, 1996).

De modo a favorecer o processo fermentativo, deve-se selecionar um microrganismo que apresente as seguintes características (VASCONCELOS, 2015):

- predominância durante a safra e estabilidade genética;
- alta velocidade de fermentação;
- elevada conversão de açúcares à etanol;
- alta produtividade em etanol;
- baixa formação de glicerol e espuma;
- tolerância a altas concentrações de substrato;

- resistência a altas concentrações de etanol, para diminuir o consumo de vapor no processo de destilação, diminuir a produção de vinhaça e possibilitar fermentar com mosto mais concentrado em açúcares;
- resistência a acidez, importante quando adiciona-se ácido sulfúrico para o controle de contaminação por bactérias;
- resistência a altas temperaturas, importante em regiões de clima quente;
- flocculante, quando se quer eliminar a necessidade de centrifugação.

2) Concentração celular, de açúcares e de etanol

Em termos de concentração celular, pode-se inferir que altos valores de concentração conduzem a períodos curtos de fermentação e aumentam a produtividade, enquanto que baixa concentração conduz a períodos longos de fermentação (VASCONCELOS, 2015).

No que se refere a quantidade de açúcares redutores totais (ART) e de etanol, dependendo da concentração em que se encontram no meio, podem exercer efeito inibitório sobre o metabolismo das leveduras (VASCONCELOS, 2015), diminuindo a velocidade de crescimento, produção de metabólitos e/ou comprometendo a viabilidade celular, no caso de inibição por produto.

Para se evitar ou minimizar os efeitos da inibição e para se manter a eficiência e produtividade do processo fermentativo, a adição de açúcares deve ser realizada de modo controlado. A adoção de um perfil adequado de adição de substrato reduz o tempo de fermentação, aumenta a eficiência do processo e reduz o consumo de antiespumante. No caso de cultivo aeróbio para produção de biomassa, é conveniente trabalhar com baixas concentrações de açúcar e aeração, para se evitar a repressão da respiração celular que pode ocorrer em altas concentrações de açúcares, mesmo na presença de oxigênio (efeito de *Crabtree*). Já em cultivos anaeróbios, cujo objetivo é a produção de etanol, este efeito é benéfico. Contudo, altas concentrações de açúcares podem acarretar em estresse osmótico, produção elevada de etanol (inibição do metabolismo celular), fermentação incompleta e formação de produtos indesejáveis, que podem reduzir a eficiência do processo (VASCONCELOS, 2015). Nas usinas brasileiras, a concentração máxima de substrato nas dornas normalmente não excede 170 g/L (BASSO *et al.*, 2011). Com relação à concentração de substrato que leva à inibição do metabolismo celular de leveduras, Thatipamala *et al.* (1992) observaram este efeito em concentrações acima de 150 g/L de glicose. Fernández-Lopez *et al.*

(2011) verificaram capacidade de crescimento até uma concentração de 291 g/L de açúcares e Zhang *et al.* (2015) observaram inibição do crescimento celular em concentrações acima de 160 g/L de glicose.

Durante o processo de fermentação a concentração de etanol pode aumentar até mesmo quando o crescimento celular cessa. Normalmente o efeito de inibição por este produto tem início aos 40 g/L (AIBA *et al.*, 1968), sendo que aos 112 g/L, observa-se que os microrganismos param de crescer e ao redor de 115 g/L a produção de etanol cessa (LUONG, 1985). Para tentar minimizar ou até mesmo eliminar este efeito pode-se recorrer a técnicas de remoção deste produto do meio fermentativo (PINTO, 2014; KUMAR *et al.*, 2015; PONCE, 2015; SONEGO, 2016).

Tanto os valores de concentração de açúcares, quanto os de concentração de etanol que levam a inibição do metabolismo celular podem variar dependendo do microrganismo e das condições do processo fermentativo.

3) Nutrientes

A concentração de nutrientes no meio fermentativo é de extrema importância para o bom andamento do processo fermentativo. Se o meio possuir quantidades inadequadas de nutrientes, a multiplicação das células e a velocidade de fermentação poderão ser afetadas (VASCONCELOS, 2015).

As leveduras precisam que o meio fermentativo possua fontes de carbono, fontes de vitaminas, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, ferro, cobre, cobalto, iodo, entre outros. As células de *S. cerevisiae*, por exemplo, absorvem o nitrogênio nas formas amoniacal, amídica (ureia) ou amínica; o fósforo, na forma de íon $H_2PO_4^-$ e o enxofre, na forma de sulfato, sulfito ou tiosulfato (VASCONCELOS, 2015).

4) Temperatura

Devido ao fato do processo fermentativo ser exotérmico e das leveduras típicas usadas na fermentação serem microrganismos mesófilos (temperatura ótima 20-50 °C) (SHULER e KARGI, 2002) e, portanto, possuírem uma temperatura ótima de trabalho (30-35°C), normalmente se faz necessário o controle desta variável durante o processo de fermentação. Tal controle pode ser realizado por meio de trocadores de calor (VASCONCELOS, 2015).

No caso de aumento excessivo da temperatura, acima da ótima para as leveduras, a velocidade de crescimento destes microrganismos pode diminuir, podendo ocorrer morte celular (SHULER e KARGI, 2002). A literatura ainda indica que temperaturas altas podem aumentar o efeito inibitório do etanol, provavelmente devido ao fato da velocidade de produção deste metabólito ser mais alta que a velocidade de difusão deste produto através da membrana das células. Além de provocarem a evaporação de etanol, no caso de fermentadores abertos, influenciar no tempo de fermentação e na produtividade do processo (VASCONCELOS, 2015).

5) Agitação

A agitação é um fator importante no processo fermentativo, pois previne a formação de depósitos, proporciona melhor representatividade das amostras, melhor viabilidade celular e principalmente, confere ao meio uniformidade, mantendo as leveduras em suspensão, promovendo assim o contato eficiente entre o microrganismo e o substrato (VASCONCELOS, 2015).

6) pH

As leveduras são microrganismos acidófilos e podem ser cultivadas em diversos valores de pHs, contudo, melhores resultados são obtidos entre 4,0-4,5. O valor do pH tem influência marcante no processo fermentativo, pois interfere no controle da contaminação por bactérias (favorecidas por pH neutro), no crescimento das células, na velocidade de fermentação e na formação de subprodutos. Os processos fermentativos que utilizam como fonte de carbono a sacarose, são mais afetados pelo valor do pH do que os que utilizam a glicose, uma vez que a atividade da enzima invertase nas leveduras é favorecida por pH ácido. Sendo assim, ácido sulfúrico pode ser adicionado em quantidades suficientes para favorecer a ação das leveduras e impedir o desenvolvimento de bactérias (VASCONCELOS, 2015).

Atualmente, no Brasil, o processo de produção de etanol de primeira geração está bem estabelecido, com os menores custos e a maior produtividade do mundo (PACHECO, 2011). Porém, é importante salientar que nos próximos anos haverá a necessidade de se aumentar a produção de etanol para atender o crescimento do consumo e da exportação deste biocombustível (FIESP, 2013). Além disso, em dezembro de 2015, na 21ª Conferência do Clima em Paris (COP 21), o Brasil assumiu o compromisso de reduzir a emissão de gases de efeito estufa (GEE). Para se alcançar este objetivo, a meta é aumentar a participação de

biocombustíveis na matriz energética do país para 18% até 2030 e para isso, a estimativa é que o Brasil terá que produzir 50 bilhões de litros de etanol carburante – atualmente este valor é de 28 bilhões de litros (UNICA, 2015). Assim como na COP 21, no Protocolo de Quioto, o Brasil apresentou um conjunto de ações voluntárias para reduzir as emissões de GEE entre 36,1 e 38,9% até 2020. Dentre estas ações está a ampliação do uso de biocombustíveis (MAPA, 2012).

Dentro deste contexto, o aumento na produção do biocombustível etanol pode ocorrer tanto pelo aperfeiçoamento das tecnologias para produção de etanol de primeira geração (1G), quanto pelo desenvolvimento científico e tecnológico para produção de etanol de segunda geração (2G). Dentre as possibilidades de otimização da produção de etanol 1G, destacam-se a aplicação de melhores práticas agrônômicas, a seleção de novas linhagens de levedura, o desenvolvimento de tecnologias de extração de etanol que minimizem o efeito inibitório do metabolismo celular, a redução dos níveis de formação de subprodutos, estratégias para operar o fermentador com maior densidade celular, a integração energética eficiente da planta de produção de etanol, a racionalização do uso de água (PACHECO, 2011) e a introdução de novas matérias-primas capazes de aumentar os níveis de produção (PACHECO^b, 2012).

2.3 Leveduras termotolerantes

Denominam-se como leveduras termotolerantes, aquelas capazes de manter o seu metabolismo a temperaturas iguais ou acima de 40 °C (BANAT *et al.*, 1998). Há várias formas de se obter ou melhorar esta característica nos microrganismos como, por exemplo, por meio de seleção e isolamento de linhagens presentes na natureza (ABDEL-FATTAH *et al.* 1999; LIMTONG *et al.*, 2007), engenharia genética (NONKLANG *et al.*, 2008), técnicas de mutagênese (PANG *et al.*, 2010; HUGHES *et al.*, 2012) e engenharia evolutiva (WALLACE-SALINAS e GORWA-GRAUSLUND, 2013).

A produtividade do processo fermentativo está atrelada a atividade das leveduras e dentre os fatores que podem influenciar o metabolismo das células, destaca-se a temperatura. Normalmente há um controle desta variável, pois o processo ocorre na faixa de temperatura ótima para as leveduras (30-35 °C) e as reações envolvidas na fermentação são exotérmicas (VASCONCELOS, 2015). Contudo, em locais de clima quente manter a temperatura ótima de fermentação pode se tornar caro ou inviável. Neste contexto surgiu a necessidade de se utilizar leveduras que pudessem manter suas atividades celulares em temperaturas mais altas

(HACKING *et al.*, 1984), evitando assim possíveis paradas na produção devido à elevação da temperatura dos biorreatores (BANAT *et al.*, 1998).

Além disso, a utilização de leveduras termotolerantes pode proporcionar economia de energia devido à redução nos gastos com resfriamento dos reatores (KUMAR^a *et al.*, 2013), aumento da produtividade (altas taxas de consumo de substrato e de formação de produto) (EIADPUM *et al.*, 2012), possibilidade de se utilizar o processo de arraste gasoso como método para extração de etanol (BANAT *et al.*, 1998) e restrição nas chances de contaminação por microrganismos mesófilos, como *Williopsis sp.*, *Candida sp.*, *Zygosaccharomyces sp.* (NUANPENG *et al.*, 2016). Podem ainda serem utilizadas na otimização da produção de etanol de segunda geração, mais especificamente em processos simultâneos de sacarificação e fermentação, os quais possuem diferentes temperaturas ótimas, $\approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as enzimas e $\approx 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as leveduras (SOUZA *et al.*, 2012) e se empregadas na produção de etanol a partir de matéria-prima amilácea, podem proporcionar redução de custos com resfriamento, pois neste processo é necessário reduzir a temperatura da matéria-prima antes de começar a sacarificação e fermentação (BABIKER *et al.*, 2010).

Leveduras dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* já foram testadas para algumas das aplicações citadas acima (HACKING *et al.*, 1984; SOUZA *et al.*, 2012; KUMAR^b *et al.*, 2013). A levedura *Kluyveromyces marxianus* é conhecida principalmente devido à sua capacidade de manter atividade metabólica em temperaturas elevadas. Estudos indicam capacidade fermentativa desta levedura em temperaturas que variam de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (GOUGH *et al.*, 1996; ABDEL-FATTAH *et al.*; 1999; LIMTONG *et al.*, 2007; PANG *et al.*, 2010 e KUMAR^b *et al.*, 2013).

A utilização de leveduras *K. marxianus* oferece como vantagem a habilidade de se utilizar uma vasta gama de substratos, tais como: caldo de cana-de-açúcar, água de maceração de milho, melaço, soro de leite (RADECKA *et al.*, 2015), substratos compostos por xilose, xilitol, celobiose, entres outros (NONKLANG *et al.*, 2008). Além de ser utilizada para produção de etanol, algumas cepas podem ser utilizadas na produção de proteínas de células (SCHULTZ *et al.*, 2006), bioingredientes (BELEM e LEE, 1998), aromas (GAO e DAUGULIS, 2009), enzimas, como inulinase (RISSO *et al.*, 2010) e β -galactosidade (MARTINS *et al.*, 2002) e em aplicações ambientais, como por exemplo, na remoção de corantes (MEEHAN *et al.*, 2000).

No que se refere ao metabolismo desse gênero, diz-se que este é respiratório fermentativo (capacidade de gerar energia tanto pela respiração quanto pela fermentação)

(PISKUR *et al.*, 2006; RADECKA *et al.*, 2015), sendo que algumas linhagens são classificadas como *Crabtree* negativas (tendência de produzir acetato e piruvato quando expostas a excesso de açúcar) (HENSING *et al.*, 1994) ou *Crabtree* positivas (tendência de produzir etanol quando expostas a excesso de açúcar) (DASGUPTA *et al.*, 2014).

Como o foco desta dissertação é a produção de etanol, destacam-se na sequência trabalhos que utilizaram a levedura *K. marxianus* na produção deste composto.

Limtong *et al.* (2007) investigaram o processo fermentativo em frascos agitados da linhagem *K. marxianus* DMKU3-1042 nas temperaturas de 37 e 40 °C, em caldo de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes e fonte de carbono em diversas proporções. Os melhores resultados foram obtidos a 37 °C e com meio composto por caldo de cana-de-açúcar suplementado com 22% de açúcares, 0,05% de (NH₄)₂SO₄, 0,05% de KH₂PO₄ e 0,15% MgSO₄ .7H₂O, nesta condição foi produzido 8,7% m/v de etanol, a produtividade foi de 1,45 g/L·h e o rendimento foi de 77,5% do rendimento teórico. A 40 °C a concentração de etanol foi de 6,78% m/v, a produtividade de 1,13 g/L·h e o rendimento de 60,4%.

Pang *et al.* (2010) estudaram a produção de etanol da linhagem mutante *K. marxianus* GX-UN120 em frascos agitados, a 40 °C, em meio YPD com concentração de glicose de 150 g/L e obtiveram ao final da fermentação uma concentração de etanol de 69 g/L e coeficiente de rendimento em etanol de 0,46 g/g. Segundo os autores o rendimento obtido foi próximo ao da linhagem de *S. cerevisiae* (30-32 °C), em contrapartida a velocidade de consumo de glicose e a tolerância ao etanol foram menores para a levedura termotolerante.

Gough *et al.* (1996) realizaram ensaios de fermentação com a linhagem *K. marxianus* IMB3 em frascos agitados, a 45 °C, utilizando melaço (23% v/v) puro e suplementado. No ensaio com melaço puro a concentração máxima de etanol obtida foi de 7,4% v/v, a produtividade de 1 g/L·h e o rendimento de 89% em relação ao teórico. Já no ensaio com melaço suplementado, a concentração máxima de etanol foi de 8,5% v/v, a produtividade de 4,8 g/L·h e o rendimento de 98,9%. Singh *et al.* (1998) examinaram o processo de fermentação da linhagem *K. marxianus* IMB3 em comparação com uma linhagem comercial de *S. cerevisiae* em escala industrial. Os autores utilizaram como meio fermentativo melaço com 16% m/v de açúcares e não houve controle de temperatura quando se utilizou a linhagem termotolerante, sendo que a temperatura durante o processo variou de 28-42 °C. Os rendimentos nos diferentes ciclos com a linhagem *K. marxianus* IMB3 ficaram entre 6,0-7,2% m/v, muito semelhantes aos da linhagem de *S. cerevisiae*, que ficaram na faixa de 6,5-7,2% m/v. Foi apontado como vantagens do uso da levedura *K. marxianus*, o menor tempo de fermentação e a não necessidade

de uso de sistema de resfriamento. Hack e Marchant (1998) verificaram que em condição aeróbia, a linhagem *K. marxianus* IMB3 tem crescimento inibido em concentrações de açúcar em torno de 100 g/L e 45 °C. Com oxigenação limitada a linhagem demonstrou ser pouco tolerante ao etanol, alcançando no máximo 40 g/L deste produto (concentração de glicose mantida entre 20-100 g/L), nesta mesma temperatura. E por fim, os autores verificaram que a linhagem *K. marxianus* IMB3 não foi capaz de manter crescimento sob condições anaeróbias.

Abdel-Fattah *et al.* (1999) estudaram em frascos agitados e em escala industrial o processo fermentativo das linhagens termotolerantes *S. cerevisiae* F111 e *K. marxianus* WR12 e compararam os seus desempenhos com o da linhagem industrial *S. cerevisiae* SIIC. Tanto em escala industrial quanto em escala laboratorial, foi utilizado como meio de fermentação melão de cana-de-açúcar (180 g/L ART) e temperatura de 40 °C para a linhagem industrial e 43 °C para as linhagens termotolerantes. Em frascos agitados, a linhagem termotolerante *S. cerevisiae* F111 produziu 84 g/L de etanol, com produtividade de 2,33 g/L·h, rendimento de 0,48 g/g e utilizou 175 g/L de açúcares em 36 h. A linhagem termotolerante *K. marxianus* WR12 produziu 80,6 g/L de etanol, com produtividade de 2,88 g/L·h, rendimento de 0,47 g/g e utilizou 171,9 g/L de açúcares em 28 h. A linhagem industrial produziu 71 g/L de etanol, com produtividade de 1,37 g/L·h, rendimento de 0,44 g/g e utilizou 159,6 g/l de açúcares em 52 h. Em escala industrial, o processo fermentativo das linhagens termotolerantes foi realizado sem a necessidade do uso de resfriamento, enquanto que no processo com a linhagem industrial foi necessário usar resfriamento para poder finalizar o processo de fermentação. No que diz respeito aos resultados obtidos em escala industrial, utilizando a linhagem *S. cerevisiae* F111, o processo durou 27,5 h, a temperatura variou na faixa de 36-45 °C e a concentração final de etanol foi de 77,3 g/L. Para a linhagem *K. marxianus* WR12, o processo durou 27,8 h, a temperatura variou na faixa de 39-43 °C e a concentração final de etanol foi de 74,1 g/L. E por fim, utilizando a levedura industrial, o processo durou 38 h, a temperatura variou na faixa de 35-40 °C e a concentração final de etanol foi de 65,8 g/L. Na Tabela 2 os principais resultados obtidos por Abdel-Fattah *et al.* (1999) são apresentados.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais obtidos em cultivos em frascos agitados utilizando leveduras termotolerantes e convencional.

	C_E (g/L)	$Y_{E/S}$ (g/g)	P_V (g/L·h)
<i>K. marxianus</i> WR12	80,6	0,47	2,88
<i>S. cerevisiae</i> F111 (termotolerante)	84	0,48	2,33
<i>S. cerevisiae</i> SIIC (industrial)	71	0,44	1,37

C_E : concentração de etanol; $Y_{E/S}$: coeficiente de rendimento em etanol;

P_V : produtividade volumétrica.

Fonte: adaptado de Abdel-Fattah *et al.* (1999).

Arora *et al.* (2015) realizaram ensaio de fermentação com a linhagem *K. marxianus* NIRE-K3 em biorreator com concentração inicial de glicose de 100 g/L a 45,4 °C. Em 16 h o açúcar foi 100% consumido, a concentração final de etanol foi de 43,25 g/L, a velocidade específica de crescimento de 0,024 h⁻¹, o coeficiente de rendimento célula-substrato de 0,041 g/g e o coeficiente de rendimento etanol-substrato de 0,43 g/g.

Dasgupta *et al.* (2014) estudaram o processo fermentativo da linhagem *Kluyveromyces sp.* IIPE453, a 45 °C, em biorreator, utilizando como substrato melaço de cana-de-açúcar. Os autores testaram diferentes concentrações iniciais de células e de substrato. A melhor combinação foi com uma concentração inicial de células de 3,05 g/L e 100 g/L de açúcares, nesta condição os autores conseguiram obter uma concentração máxima de etanol de 42 g/L, um coeficiente de rendimento etanol-substrato de 0,467 g/g e produtividade específica em etanol de 0,69 g/g/h. Kumar^b *et al.* (2013) realizaram um estudo cinético da fermentação da linhagem *Kluyveromyces sp.* IIPE453. As fermentações foram conduzidas a 50 °C em biorreator e o efeito da concentração de glicose foi observado (200, 250 e 300 g/L). O modelo de Aiba foi o que melhor descreveu a inibição por substrato e o modelo de Luong foi o mais adequado para descrever a inibição pelo etanol. A concentração de glicose que proporcionou melhores resultados foi 200 g/L, sendo que nesta condição a produtividade volumétrica foi de 2,28 g/L·h e a produtividade específica em etanol foi de 0,63 g/g/h. Com relação à quantidade de etanol máxima, não houve diferença entre as fermentação com 200, 250 e 300 g/L de glicose, sendo produzido em torno de 86,5 g/L de etanol ao final das fermentações.

Nuanpeng *et al.* (2016) estudaram o processo fermentativo de diferentes linhagens de *K. marxianus* e de uma linhagem termotolerante de *S. cerevisiae*. Os ensaios foram realizados em frascos agitados em meio composto por caldo de sorgo sacarino puro com

concentração de açúcares de 220 g/L e temperatura de 40 °C. O melhor resultado dentre as linhagens de *K. marxianus* foi para a DBKKU Y-103, cuja concentração final de etanol foi de 31,63 g/L e produtividade volumétrica de 0,44 g/L·h. Já para a linhagem termotolerante de *S. cerevisiae* DBKKU Y-53 a concentração final de etanol foi de 58,2 g/L e produtividade de 1,62 g/L·h. Os autores deste trabalho também avaliaram a influência da temperatura (30, 37, 40, 42 e 45 °C), concentração inicial de açúcares (200, 250 e 300 g/L), pH (4, 4,5, 5, 5,5, 6) e adição de fontes de nitrogênio (extrato de levedura, ureia e (NH₄)₂SO₄), para estes ensaios a linhagem termotolerante *S. cerevisiae* DBKKU Y-53 foi a escolhida por ter tido melhor desempenho. Nos ensaios com diferentes temperaturas comparou-se o desempenho da levedura termotolerante com uma levedura industrial. Observou-se que a produtividade volumétrica e concentração de etanol foram diminuindo com o aumento da temperatura. O que foi atribuído ao efeito negativo de altas temperaturas no crescimento e metabolismo das leveduras. Quando o resultado dos cultivos empregando a linhagem termotolerante e industrial foram comparados, os autores constataram resultados semelhantes entre ambas linhagens na temperatura de 30 °C. Contudo, a 37 e 40 °C obtiveram-se os melhores valores para concentração de etanol e produtividade com a linhagem termotolerante. Na Tabela 3 apresentam-se os resultados obtidos por Nuanpeng *et al.* (2016) nos ensaios realizados em frascos agitados em diferentes temperaturas.

Tabela 3 - Concentração de etanol e produtividade volumétrica obtidos em diferentes temperaturas utilizando linhagem de *S. cerevisiae* termotolerante e industrial.

T (°C)	Levedura termotolerante		Levedura industrial	
	C _E (g/L)	P _V (g/L·h)	C _E (g/L)	P _V (g/L·h)
30	82,77±1,99	2,30±0,06	83,30±2,26	1,74±0,05
37	71,73±2,62	1,49±0,05	63,22±2,42	1,32±0,05
40	58,14±7,71	1,61±0,20	53,68±1,17	1,12±0,02
42	32,30±0,49	0,67±0,01	32,54±1,56	0,68±0,03
45	9,08±4,02	0,19±0,08	17,69±2,54	0,37±0,05

T: temperatura; C_E: concentração de etanol; P_V: produtividade volumétrica.

Fonte: adaptado de Nuanpeng *et al.* (2016).

Com relação aos estudos que avaliaram diferentes concentrações de açúcares, pH e fontes de nitrogênio, os melhores resultados foram obtidos para uma concentração inicial

de açúcares de 250 g/L, pH de 5,5 e ureia como melhor fonte de nitrogênio. Um ensaio em biorreator foi realizado com estas condições, os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados do processo de produção de etanol em biorreator utilizando caldo de sorgo sacarino e leveduras termotolerante e industrial.

	T (°C)	C_E (g/L)	P_v (g/L·h)	Y_{E/S} (gp/gs)	t (h)	Utilização de açúcar (%)
Termotolerante	37	106,82±0,01	2,23±0,01	0,45±0,02	48	91,84±0,20
	40	85,01±0,03	2,83±0,02	0,42±0,01	30	79,35±0,05
Industrial	37	91,59±0,01	3,82±0,02	0,47±0,01	24	82,68±0,02
	40	78,69±0,02	3,28±0,03	0,46±0,02	24	68,19±0,02

T: temperatura; C_E:concentração de etanol; P_v: produtividade volumétrica; Y_{E/S}: coeficiente de rendimento em etanol; t: tempo.

Fonte: adaptado de Nuanpeng *et al.* (2016).

Para uma melhor avaliação dos estudos relatados, na Tabela 5 é possível observar um resumo dos resultados obtidos nos estudos que utilizaram linhagens de *K. marxianus*.

Tabela 5 - Parâmetros operacionais obtidos em cultivos de diferentes cepas da levedura *K. marxianus*.

	T (°C)	C_E	P_v (g/L·h)	Y_{E/S} (g/g)	Eficiência (%)
Limtong <i>et al.</i> (2007) (<i>K. marxianus</i> DMKU3-1042) (frascos agitados)	37	8,7% (w/v)	1,45	-	78
Pang <i>et al.</i> (2010) (<i>K. marxianus</i> GX-UN120) (frascos agitados)	40	69,0 g/L	-	0,46	91
Nuanpeng <i>et al.</i> (2016) (<i>K. marxianus</i> DBKKU Y-103) (frascos agitados)	40	31,6 g/L	0,44	-	-

(Cont.) Tabela 5 - Parâmetros operacionais obtidos em cultivos de diferentes cepas da levedura *K. marxianus*.

Abdel-Fattah <i>et al.</i> (1999) (<i>K. marxianus</i> WR12) (frascos agitados)	43	80,6 g/L	-	0,47	91
Arora <i>et al.</i> (2015) (<i>K. marxianus</i> NIRE-K3) (biorreator)	45	43,2 g/L	-	0,43	-
Gough <i>et al.</i> (1996) (<i>K. marxianus</i> IMB3) (frascos agitados)	45	8,5% (v/v)	4,8	-	99
Dasgupta <i>et al.</i> (2014) (<i>Kluyveromyces sp.</i> IIPE453) (biorreator)	45	42,0 g/L	-	0,47	92
Kumar ^b <i>et al.</i> (2013) (<i>Kluyveromyces sp.</i> IIPE453) (biorreator)	50	86,5 g/L	2,28	-	-

T: temperatura; C_E:concentração de etanol; Pv: produtividade volumétrica; Y_{E/S}: coeficiente de rendimento em etanol.

As leveduras termotolerantes têm sido estudadas devido às inúmeras vantagens que elas oferecem em termos de economia, restrição nas chances de contaminação por microrganismos mesófilos e otimização de processos. Com o relatado neste tópico, observa-se que leveduras termotolerantes possuem melhor desempenho em temperaturas mais altas do que leveduras industriais. Verifica-se ainda que diferentes linhagens de *K. marxianus* podem possuir diferentes temperaturas ótimas de trabalho e diferentes valores de concentração de etanol máxima, rendimento e produtividade. O que pode ser explicado devido as linhagens terem sido preservadas, manipuladas e obtidas de formas e fontes diferentes e é sabido que esta espécie apresenta um alto nível de polimorfismo intraespecífico (BELLOCH *et al.*, 1998), podendo ter uma alta taxa de mutação, o que resulta em uma evolução rápida e inesperada durante os passos de propagação que estão envolvidos desde o estoque até o cultivo (FONSECA *et al.*, 2007). Contudo, a partir do amplo espectro de estudos biotecnológicos desta levedura, já se tornou evidente que a diversidade está presente dentro da espécie. Como exemplo disso, Lane *et al.* (2011) submeteram 13 linhagens de *K. marxianus* a um teste de tolerância a

temperaturas que variaram de 24-48 °C, todas as linhagens apresentaram crescimento similar até 42 °C, contudo a 48 °C, sete linhagens não cresceram, quatro tiveram o crescimento prejudicado e apenas duas apresentaram bom crescimento.

2.4 Sorgo sacarino como matéria-prima para produção de etanol

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) provavelmente é de origem africana, mas há indícios de que houve duas regiões independentes de disseminação desta cultura: África e Ásia. A introdução do sorgo no Oriente e Europa se deu através de rotas comerciais marítimas e terrestres e na América, o sorgo chegou através dos escravos africanos (RIBAS, 2007).

Na safra de 2015/2016 o sorgo foi o quinto cereal mais produzido no mundo, sendo os maiores produtores desta cultura os EUA, Nigéria, México, Sudão e Índia. O Brasil ocupou a décima posição, com uma produção de 1850 mil toneladas de sorgo (DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS EUA, 2016), sendo a região Centro-Oeste, mais especificamente o estado de Goiás, o maior produtor desta cultura no país (CONAB, 2016).

Agronomicamente, o sorgo pode ser classificado em granífero, forrageiro, sacarino e vassoura (Figura 5). A partir do processamento do grão do sorgo granífero pode-se obter ração animal, farinha, amido e cerveja. A biomassa do sorgo forrageiro é apropriada para produção de silagem e feno. O colmo do sorgo sacarino contém açúcares fermentáveis podendo ser utilizado na produção de etanol e a panícula do sorgo vassoura pode ser utilizada na produção de vassouras e escovas (SHIMIDT, 1987).

Figura 5 - Tipos de sorgo: (a) granífero, (b) forrageiro, (c) sacarino e (d) vassoura.



Fonte: (a) Embrapa (2008); (b) Biomatrix (2016); (c) Embrapa (2015) e (d) MF RURAL (2016).

Dentre os tipos de sorgo, o sacarino tem ganhado especial destaque e tem se mostrado como uma alternativa promissora para a produção de etanol.

O sorgo sacarino possui colmos ricos em açúcares fermentescíveis, é uma cultura de ciclo rápido de crescimento (quatro meses) e totalmente mecanizável (plantio por sementes, tratamentos culturais e colheita). Possui alta produtividade de biomassa verde (60-80 t/ha), altos rendimentos de etanol (3000-6000 L/ha) e os açúcares redutores totais variam entre 80-127 kg/t de massa verde. Após extração do caldo, o bagaço pode servir como fonte de energia (vapor e cogeração) (DURÃES, 2011) e para produção de etanol 2G (MACHADO, 2011). Os grãos do sorgo (produção de 2,5 t/ha) possuem características nutricionais similares às do milho e podem ser utilizados na alimentação humana e/ou animal (DURÃES, 2011) ou ainda na produção de etanol em processo similar à produção de etanol de milho (BARCELOS *et al.*, 2011). Esta espécie é considerada rústica, pois possui a capacidade de se adaptar a ambientes de extremo estresse abiótico, de temperatura do ar e de umidade do solo. Porém, é responsiva às boas práticas agrícolas e de manejo de cultura (PURCINO, 2011). Trata-se de uma planta com metabolismo C4, ou seja, apresenta altas taxas fotossintéticas e é altamente eficiente na utilização da radiação solar para conversão do CO₂ em fotoassimilados (MAGALHÃES *et al.*, 2007; FERREIRA, 2012). Esta cultura é conhecida pela versatilidade, tanto do ponto de vista fotossintético, como em velocidade de maturação (RIBAS, 2007).

A utilização do sorgo sacarino na produção de etanol já é realidade em países como Índia (BUSINESS STANDART, 2007), China (USDA, 2014), Austrália (UNITED ETHANOL, 2016) e Estados Unidos (ETHANOL PRODUCER MAGAZINE, 2016). Contudo, trata-se de uma aplicação recente que vem recebendo atenção de pesquisadores e investidores ao redor do mundo.

Como exemplos de usinas em construção, cita-se a recente aplicação de empresas dos EUA e da China na construção de uma usina em Limpopo, África do Sul (PORTAL JORNAL CANA, 2016) e a primeira usina de etanol de milho/sorgo do Brasil, que está em construção em Lucas do Rio Verde (MT) (NOVA CANA, 2016). Com relação à pesquisa e desenvolvimento envolvendo a produção de etanol com sorgo sacarino destacam-se estudos de diferentes variedades de sorgo sacarino (RATNAVATHI *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2014), fermentação VGH (alta concentração de açúcar 200-300 g/L) (YUE *et al.*, 2012; DEESUTH *et al.*, 2015), possibilidade de se utilizar todas as partes do sorgo na produção de etanol (KIM *et al.*, 2012), etanol 2G (CAO *et al.*, 2012), fermentação no estado sólido (LI *et al.*, 2013), processos simultâneos de sacarificação e fermentação (WANG *et al.*, 2013),

fermentação utilizando leveduras imobilizadas (ARIYAJAROENWONG *et al.*, 2012) e, por fim, métodos de extração (GUIGOU *et al.*, 2011) e clarificação (ANDRZEJEWSK *et al.*, 2013) do caldo do sorgo. Além destes temas, estudos recentes demonstraram que o desempenho do sorgo pode ser comparado com o das duas matérias-primas mais utilizadas na produção de etanol, cana-de-açúcar (Tabela 6) e milho (Tabela 7).

Tabela 6 - Parâmetros de desempenho do sorgo sacarino como matéria-prima para produção de etanol em comparação com a cana-de-açúcar.

	ART (g/L)	Y _{E/ART} (%)	P _{etanol} (g/Lh)
Sorgo sacarino	158,2	90,5	9,0
Cana-de-açúcar	157,9	91,0	9,2

ART: Açúcares redutores totais; Y_{E/ART}: rendimento médio de etanol em relação à quantidade de açúcares consumidos; P_{etanol}: produtividade média em etanol.

Fonte: Fernandes *et al.* (2014).

Tabela 7 - Desempenho do sorgo sacarino como matéria-prima para produção de etanol em comparação com o milho.

	Rendimento em amido (t/ha)	Rendimento em açúcar (t/ha)	Rendimento em etanol (L/ha)
Sorgo sacarino	-	9,5	5479,9
Milho	7,1	7,9	4597,8

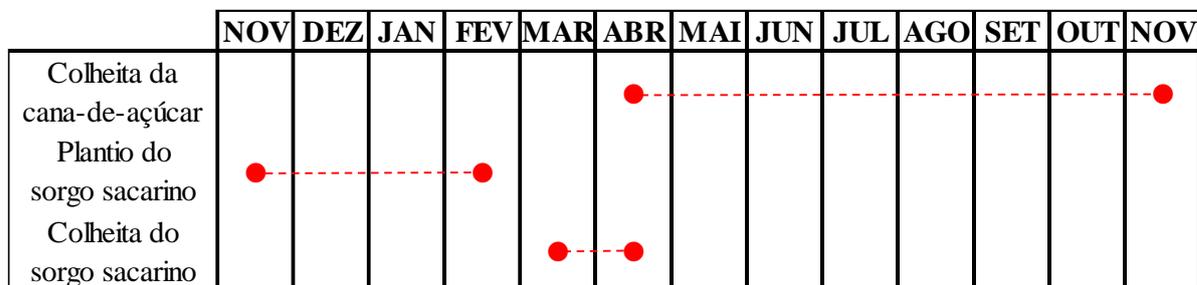
Fonte: Vlachos *et al.* (2014).

No Brasil, a possível utilização desta matéria-prima tem como objetivo complementar a produção de etanol na entressafra da cana-de-açúcar, reduzindo o período de ociosidade das destilarias ao antecipar de 2 a 3 meses a moagem nas usinas, uma vez que é possível utilizar a mesma instalação para o processamento de ambas culturas (semelhanças físicas e de constituintes) (DURÃES, 2011). O Proálcool já previa a utilização do sorgo para produção de etanol em microdestilarias, pois não havia como distribuir o álcool em regiões mais afastadas dos centros produtores. Contudo, em 1985 a política de incentivo foi para as grandes destilarias que, por sua vez não aceitaram a ideia de processar esta matéria-prima. A retomada das pesquisas sobre produção de etanol a partir do sorgo ocorreu em 2008, quando muitas usinas foram compradas por grandes grupos nacionais e internacionais que constataram que a produção era interrompida em alguns meses do ano devido à entressafra da cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 2012).

2.4.1 Sorgo sacarino no cenário brasileiro: complemento da produção de etanol da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pode ser plantada entre setembro e dezembro (ciclo de 12 meses), janeiro e março/abril (ciclo de 16-18 meses) ou entre maio e agosto (ciclo de inverno) (BARBOSA, 2015), sendo que a entressafra nas regiões centro-sul ocorre entre novembro e março (dependendo do ciclo da cana). Durante a entressafra há redução na produção de etanol, o que causa a elevação no preço desse biocombustível e ociosidade nas destilarias. O cultivo e processamento do sorgo durante este período aumentaria e complementaria a produção de etanol (PACHECO^b, 2012) sem risco de competição com a área de produção de cana, pois o sorgo pode ser cultivado em áreas de reforma de canaviais, em locais considerados marginais para a cana ou que não tenham sido contemplados no zoneamento de riscos climáticos para a cultura (EMYGDIO *et al.*, 2011). Na Figura 6 pode-se visualizar como o sorgo preencheria a entressafra da cana-de-açúcar.

Figura 6 - Cronograma do plantio e colheita do sorgo e da cana-de-açúcar nas regiões centro-sul.



Fonte: adaptado de Oliveira (2012).

Em termos de processo, devido à similaridade entre a cana-de-açúcar e o sorgo, é possível utilizar a mesma instalação industrial para o processamento de ambas culturas, exceto por alguns parâmetros operacionais, adaptações nas análises e em algumas etapas do processo. Tais adaptações devem ser levadas em conta de modo a tornar possível a exploração de todo o potencial do sorgo, evitando decorrentes falhas no processamento. Como diferenças entre ambas matérias-primas, destaca-se que o sorgo possui menor concentração de sacarose e maior teor de açúcares redutores (glicose e frutose), amido, fibra, sólidos solúveis (menor pureza) e impurezas vegetais (por exemplo, palha e folhas) (PACHECO^b, 2012). A maior concentração de glicose pode oferecer risco de contaminação, pois as bactérias contaminantes normalmente

fermentam prioritariamente a glicose (MACHADO, 2011). A presença de amido pode elevar o teor de açúcares pelo emprego de amilases. A maior quantidade de fibra, requer ajustes na extração e embebição, com o intuito de se evitar problemas de embuchamento e perda de eficiência na extração. A menor pureza do caldo do sorgo pode interferir na leitura do °Brix e pode haver a necessidade de se utilizar maior quantidade de agentes flocculantes na etapa de decantação, o que gera maior volume de lodo (PACHECO^b, 2012). A composição nutricional desta cultura indica menores teores de nitrogênio amoniacal e fósforo e elevados teores de alumínio e de potássio, podendo ser necessário a adequação do teor de nutrientes. No que diz respeito à estrutura da planta, o sorgo apresenta colmos menores, o que diminui o tempo disponível entre a colheita e o processamento devido a rápida deterioração da matéria-prima (MUTTON, 2012).

Como semelhanças destaca-se a possibilidade de emprego das mesmas linhagens de leveduras utilizadas na fermentação da cana, o que elimina a necessidade de se desenvolver novos microrganismos (ALMEIDA e FÁVARO, 2011) e o bagaço do sorgo, que assim como o da cana, pode ser utilizado na produção de etanol 2G e apresenta como vantagem menor teor de lignina, o que facilita a hidrólise (MACHADO, 2011).

Na Tabela 8, 9 e 10, pode-se observar a diferença entre alguns parâmetros do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar, com destaque para as seguintes características do sorgo: menor ciclo de crescimento, produção de grãos, menor concentração de sacarose, maior concentração de açúcares redutores, menor pureza e menor teor de lignina.

Tabela 8 - Características agrônômicas do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar.

	Sorgo Sacarino	Cana-de-açúcar
Ciclo fenológico	4 meses	12-18 meses
Tipo de plantio	Propagação por sementes	Propagação Vegetativa
Plantio, tratos culturais e colheita	Mecanizável	Mecanizável
Produção de grãos	Produz (\approx 2,5 t/ha)	Não produz
Demanda de água (mm/período total de crescimento)	450-650	1500-2500
Consumo de fertilizantes N, P₂O₅, K₂O (kg/há)	81	206

Fonte: FAO 1986; Coelho *et al.* (2002); Durães (2011); Barbosa (2015); Santos e Diola (2015); Nova Cana (2016).

Tabela 9 - Características da fibra do bagaço do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar.

	Cana-de-açúcar¹	Sorgo Sacarino²
Celulose	34,9	21,3
Hemicelulose	22,7	11,6
Lignina	29,3	10,3
Extrativos*	2,3	42,0
Cinzas	3,3	0,55

*taninos, pigmentos, alcaloides, óleos essenciais, resinas e graxas.

Fonte: Rabelo (2010)¹; Barcelos (2012)².

Tabela 10 - Características do caldo extraído do sorgo sacarino e da cana-de-açúcar.

	Sorgo Sacarino	Cana-de-açúcar
°Brix	15-19	18-25
Pureza	60-75	80-90
Fibra (%)	12-20	10-15
Sacarose no caldo (%)	8-13	14-22
Açúcares Redutores no caldo (%)	1-3	0,5-1
Glicose no caldo (%)	0,5-2	0,2-1
Frutose no caldo (%)	0,5-1,5	0-0,5
Açúcares Redutores Totais no caldo¹ (%)	12-17	15-24
Amido no caldo (%)	Até 0,5	0,001-0,05

¹mínimo de 12,5% para se obter uma produção econômica e sustentável a partir do sorgo sacarino e ter conversão completa de açúcar em etanol entre 6 a 10 h (SCHAFFERT e PARRELLA, 2012)

°Brix: sólidos solúveis; Pureza: relação entre a porcentagem em massa de sacarose e de sólidos solúveis contida em uma solução açucarada; Fibra: porcentagem em massa de matéria seca insolúvel; Açúcares redutores: quantidade de açúcar invertido (glicose, frutose e outras substâncias redutoras); Açúcares redutores totais: quantidade de açúcares obtidos pela hidrólise total da sacarose.

Fonte: Pacheco^a (2012).

Pacheco *et al.* (2014) avaliaram a fermentação de diferentes variedades de sorgo (BRS 506, 507, 508, 511) e linhagens de *S. cerevisiae* (CAT-1, PE-2 e SA-1). Com relação ao desempenho das leveduras, não houve diferença entre as cepas. Já com relação às variedades de sorgo, houve discrepância entre as concentrações de açúcares dos caldos (ART), que variaram de 87 a 169 g/L e conseqüentemente o teor alcoólico variou de 70-90%, os autores atribuíram esta diferença ao fato de alguns cultivares terem sido colhidos com índice de maturação inadequado.

Masson *et al.* (2015) examinaram o processo fermentativo do sorgo sacarino (CVSW80007) e da cana-de-açúcar (RBB966928) a 30 °C, utilizando a estirpe FT858, com concentração inicial de 30 g/L e observaram que apesar do sorgo apresentar valores de °Brix, pH e ART adequados para o processo fermentativo, estes foram menores que os da cana-de-açúcar. Contudo, os autores consideraram que os resultados foram satisfatórios para o processamento do sorgo em abril, possibilitando a redução do período de entressafra da cana. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos por Masson *et al.* (2015).

Tabela 11 - Comparação entre ART, teor alcoólico e rendimento na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e do sorgo.

	ART (%)	Teor alcoólico (%)	Rendimento (%)
Cana	17,30	7,32	87,51
Sorgo	15,20	6,33	81,38

Fonte: adaptado de Masson *et al.* (2015).

Gomes (2014) estudou o processo fermentativo do caldo de sorgo sacarino (CVSW8007), de cana-de-açúcar (RB855453) e da mistura de ambos, como microrganismo utilizou a levedura Pedra 2. O processo fermentativo se deu a 32 °C com uma concentração inicial de células de 30 g/L. Tanto o sorgo quanto a cana foram colhidos no mês de abril, o sorgo com 125 dias após a semeadura e a cana em diferentes estágios de amadurecimento (1C - 1º corte com 12 meses de idade, 2C - 2º corte com 9 meses e 4C - 4º corte com 9 meses). Na Tabela 12 verificam-se as misturas utilizadas e os resultados para °Brix e ART do caldo, bem como a eficiência fermentativa. Observa-se que valores mais altos de ART foram encontrados no caldo de cana 1C, seguido do sorgo, cana 2C e cana 4C. Quanto as misturas, verifica-se melhora na qualidade da matéria-prima da cana 4C e decréscimo na qualidade da matéria-prima da cana 1C e 2C. Analisando os resultados da fermentação, o teor alcoólico de todos os ensaios foram próximos e o melhores resultados para eficiência fermentativa, foram para o caldo 100% cana 4C e caldo 70% sorgo+30% cana 2C, fato que foi relacionado com a menor quantidade de açúcares residuais no vinho.

Tabela 12 - Dados da fermentação empregando caldos de sorgo, de cana-de-açúcar e misturas de ambas matérias-primas.

	Brix¹ (%)	ART¹ (%)	Teor alcoólico (%)	Eficiência fermentativa (%)
100% Sorgo	17,7	13,55	7	87,7
70% Sorgo+30% Cana 1C	16,8	13,15	7,1	93,9
70% Sorgo+30% Cana 2C	15,7	12,9	7	95
70% Sorgo+30% Cana 4C	16,9	14,9	6,8	89,2
40% Sorgo+60% Cana 1C	19,6	15,6	7,1	85,9
40% Sorgo+60% Cana 2C	13,7	12,5	6,9	93,6
40% Sorgo+60% Cana 4C	16,4	14,4	6,8	82,3
100% Cana 1C	21,4	19,5	7,6	80,8
100% Cana 2C	15,4	13,4	7,3	87,2
100% Cana 4C	13,3	11,8	6,9	97,6

¹Caldo

Fonte: adaptado de Gomes (2014).

A partir dos seus resultados, Gomes (2014) inferiu que a mistura de sorgo e cana, pode trazer incrementos para as usinas, permitindo flexibilizar a colheita tanto da cana, quanto do sorgo para o caso de colheita de cana imatura.

Junqueira (2015) avaliou por meio de simulação no *software* Aspen Plus® a viabilidade técnico-econômica de se utilizar o sorgo sacarino na entressafra da cana, considerando produção de etanol e eletricidade (bagaço) utilizando os mesmos equipamentos empregados no processamento da cana. Foram avaliados dois casos: (i) ampliação da temporada em 28 dias, plantando sorgo em áreas de replantio da cana e (ii) ampliação da temporada em 60 dias com sorgo sendo plantado em áreas de replantio ou sendo fornecido por produtores independentes. No caso (i) o estudo demonstrou um aumento de 10% na produção de etanol e 5% na produção de energia elétrica e no caso (ii) houve um aumento de 20% na produção de etanol e 10% na de eletricidade.

Em suma, o sorgo se destaca agronomicamente e pela sua funcionalidade na produção de etanol. Agronomicamente, é eficiente no uso da água e de insumos, possui curto período de crescimento, apresenta bom desenvolvimento em diferentes tipos de clima e solo e é uma cultura completamente mecanizada (colheita e plantio por sementes). Quanto à sua

funcionalidade, é possível utilizar todas as suas partes na produção de etanol: os açúcares dos colmos, o amido dos grãos e o bagaço lignocelulósico, que pode ser utilizado tanto na produção de etanol 2G, quanto na produção de energia

2.5 Processos de extração de etanol por arraste gasoso

A produtividade do processo fermentativo, dentre outros fatores, está fortemente ligada à inibição do metabolismo celular ocasionada pela presença de etanol. Esse efeito pode ser observado a partir de concentrações de ≈ 40 g/L, ficando mais evidente em concentrações mais elevadas. Para minimizar ou neutralizar este efeito, pode-se recorrer a remoção deste produto do meio de fermentação. Desta forma, é possível aumentar a produtividade do processo, uma vez que baixa concentração de etanol, além de não ser o desejado, acarreta na produção de grandes volumes de vinhaça (resíduo da destilação), sendo que aproximadamente 12 L de vinhaça são produzidos para cada litro de etanol purificado (AMORIM *et al.*, 2011). Além disso, a remoção de etanol do meio diminui gastos com a purificação do produto final e permite o uso de caldos mais concentrados (GROOT *et al.*, 1989; CARDONA E SÁNCHEZ, 2007).

A remoção de etanol pode ser realizada por meio do acoplamento de diferentes operações unitárias ou através de um processo simultâneo que favoreça a retirada *in situ* deste produto do meio fermentativo (CARDONA E SÁNCHEZ, 2007). Dentre os métodos existentes, pode-se citar a remoção de etanol por vácuo, pervaporação, extração líquido-líquido, adsorção e arraste gasoso (*stripping*).

1) Processo a vácuo

No processo a vácuo, a queda de pressão faz com que os componentes que possuem alta pressão de vapor/baixa temperatura de ebulição, como o etanol, sejam transferidos para a fase vapor (PONCE, 2015). Dentro do contexto brasileiro, Atala (2004) desenvolveu um sistema que acoplou um evaporador *flash* ao fermentador, possibilitando a remoção de etanol ao longo da fermentação e o emprego de um mosto mais concentrado em açúcares.

2) Pervaporação

Na pervaporação, a corrente líquida que contém os produtos voláteis flui para um lado da membrana, enquanto que vácuo ou gás inerte é aplicado do outro lado. Os

componentes de interesse permeiam a membrana e são transferidos para a fase gasosa, o vapor resultante (permeado) é então condensado (VANE, 2005).

3) Extração líquido-líquido

Na extração líquido-líquido, o contato entre um líquido extratante e o meio fermentativo faz com que produtos da fermentação sejam transferidos para a fase extratante. Este contato pode ocorrer de forma direta, via misturador ou coluna empacotada, ou de forma indireta, utilizando membranas (perstração). Após extração, os produtos de interesse devem ser recuperados e o extratante volta para o processo (VANE, 2008).

4) Adsorção

Na adsorção, o produto de interesse é transferido de uma corrente líquida para um material adsorvente sólido. Normalmente o material adsorvente encontra-se em uma coluna empacotadora. Diferente dos sistemas que envolvem fases de gás, vapor ou líquido, o agente de extração sólido não se move através do sistema, sendo assim este processo envolve ciclos de carregamento e descarregamento do adsorvente (VANE, 2008).

5) Arraste gasoso

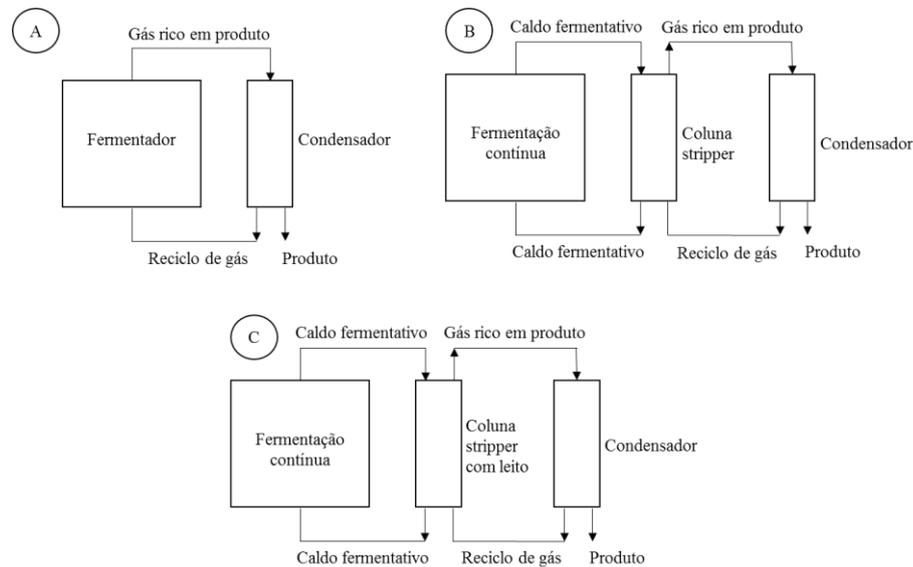
De modo geral, o arraste gasoso consiste na transferência de um determinado composto de uma fase líquida para uma fase gasosa devido a passagem de um gás através de uma solução (MULLHOLAND E SHEPPARD, 1987).

A transferência de massa (líquido-gás) que ocorre neste sistema pode ser explicada pela teoria dos dois filmes (LEWIS E WHITMAN, 1924), que é baseada nas seguintes premissas: (i) existe uma película estagnada em cada lado da interface gás-líquido, sendo que a velocidade de transferência de massa é controlada pelas velocidades de difusão nas películas estagnadas, (ii) a resistência devido à interface líquido-gás é desprezível quando comparada às resistências das películas estagnadas de gás e de líquido. Como há intensa movimentação das moléculas de gás, a resistência à transferência de massa na fase gasosa pode ser desprezada, sendo a transferência de massa do sistema governada pela película estagnada da fase líquida.

Vários tipos de gases podem ser utilizados no arraste gasoso, tais como o CO₂ e N₂, a escolha vai depender das condições do reator e da miscibilidade do componente volátil a ser recuperado (MULLHOLAND E SHEPPARD, 1987). Além das diversas opções de gás, há

diversos tipos de arranjo de equipamentos que podem ser utilizados, conforme observa-se na Figura 7.

Figura 7 - Esquema das diferentes configurações do sistema de arraste gasoso.



Fonte: adaptado de Qureshi e Blaschek (2001).

O arranjo mais comum é o arranjo A, onde o gás de arraste é inserido na parte inferior do fermentador, passa pelo condensador para recuperação do produto e retorna para o processo. No arranjo B, o caldo de fermentação passa por uma coluna *stripper* e retorna para o fermentador, enquanto que o gás rico no produto de interesse passa por um condensador, onde este produto é recuperado. E por fim, o arranjo C só se difere do arranjo B pelo uso de uma coluna *stripper* de leito empacotado.

Para que se alcance a remoção de produto desejada, alguns parâmetros devem ser controlados, são eles: vazão de gás, temperatura e densidade do meio (MULLHOLAND E SHEPPARD, 1987).

1) Vazão de gás

Alta vazão de gás aumenta a transferência de massa devido ao aumento da área de contato entre a solução e o gás, facilitando a remoção do produto de interesse. Contudo, há também remoção de água, que não é desejável, pois diminui a concentração do produto volátil no condensado (LU^b, 2011). Sendo assim, a vazão de gás ideal deve ser a suficiente para manter a concentração de etanol em valores que não sejam tóxicos aos microrganismos (PONCE,

2015). No caso de fermentação alcoólica utilizando levedura *S. cerevisiae* uma concentração de etanol ao redor de 40 g/L resulta em grande redução da inibição das células (ATALA, 2004).

2) Temperatura

Altas temperaturas fazem com que a pressão de vapor dos compostos voláteis aumente favorecendo o arraste e a recuperação destes compostos. Além disso, altas temperaturas diminuem a densidade, a tensão superficial e a viscosidade do meio fermentativo aumentando a solubilidade do substrato (LIU E HSU, 1990). Porém, as leveduras possuem uma temperatura ótima de trabalho, portanto mesmo que o processo de arraste tenha melhor rendimento a altas temperaturas deve-se utilizar a temperatura ideal para o microrganismo (SONEGO, 2016).

3) Densidade do meio

O meio fermentativo contém células, proteínas, açúcares e sais que podem aumentar a viscosidade da solução podendo impactar na performance do arraste gasoso quando comparado a uma solução sintética, com apenas água e etanol (LU^b, 2011).

A remoção de etanol do meio fermentativo pela sua transferência para a corrente gasosa é uma técnica atraente devido a sua relativa simplicidade e por se ter ainda a opção de utilizar o dióxido de carbono produzido durante a fermentação como gás de arraste (VANE, 2008). Durante a fermentação a cada 1 L de etanol produzidos são gerados 425 L de CO₂, gás este que é descartado (SONEGO, 2016). Além disso, a técnica é de baixo custo de operação, não há risco de se ter problemas de incrustação ou entupimento, como na técnica de pervaporação (PONCE, 2015), não remove nutrientes nem as células do meio (PARK E GENG, 1992) e é possível utilizar a mesma temperatura do fermentador para a remoção do etanol (VANE, 2008).

Ponce (2015) realizou ensaios de fermentação em batelada com arraste gasoso (CO₂) em reator com volume de trabalho de 7 L. O autor realizou seis experimentos variando a concentração de açúcares (170-300 g/L) e a vazão de gás (4 L/min e 6 L/min), mantendo fixos a temperatura (35 °C) e agitação (300 rpm) e obteve os seguintes resultados:

- fixando a concentração de açúcares (170 g/L) e variando a vazão de gás, o autor observou que para uma vazão de gás de 6 L/min a concentração de etanol no caldo foi menor do que para uma vazão de 4 L/min, contudo a concentração de etanol no condensado foi maior na

vazão de 4 L/min. A produtividade em etanol foi muito semelhante, 2,42 g/L.h para uma vazão de 4 L/min e 2,39 g/L.h na uma vazão de 6 L/min, estes resultados foram menores do que os da fermentação em batelada sem arraste (2,49 g/L.h);

- aumentando a concentração de açúcares (250 g/L) e variando a vazão de gás, o autor obteve menor concentração de etanol no caldo, maior concentração de etanol no condensado e maior produtividade do que nas fermentações com menor concentração de açúcares. As produtividades foram maiores do que as obtidas no ensaio em batelada sem arraste;
- aumentando ainda mais a concentração de açúcares (300 g/L) e fixando a vazão de gás em 4 L/min, a concentração de etanol no caldo (50,7 g/L), a produtividade (3,59 g/L.h) e a concentração de etanol no condensado (233,35 g/L) foram maiores do que para os experimentos anteriores.

Com estas constatações Ponce (2015) concluiu que melhores resultados podem ser obtidos com altas concentrações de açúcares e menores vazões de gás. Isso porque, menores vazões de gás aumentam a taxa de recuperação de etanol no condensado e maiores concentrações de açúcares diminuem a necessidade de acrescentar água no mosto.

Sonego (2016) também estudou o arraste gasoso (CO₂) em reator (5 L) e realizou diversos ensaios em solução hidroalcoólica variando a vazão específica de gás (1; 1,6; 2,5; 3,39 e 4 vvm), a concentração inicial de etanol (30/36,1/45/53,9 e 60 g/L) e a temperatura da solução (30; 30,8; 32; 33,2 e 34 °C). O autor constatou que vazões de gás elevadas favorecem a remoção de etanol, porém há maior arraste de água. O autor também verificou que aumentando a concentração de etanol e a temperatura da solução obtém-se maiores valores para o fator de arraste e constante de velocidade de remoção de etanol, mesmo a vazões de gás menores. Além de ensaios em solução hidroalcoólica, o autor realizou ensaios de fermentação convencional e extrativa. Nas fermentações extrativas em batelada, foi fixada a vazão específica de gás (2 vvm), a temperatura (34 °C) e o meio fermentativo, variou-se apenas o tempo de início do arraste, os resultados obtidos pelo autor foram:

- arraste com início na quinta hora de fermentação: neste momento a concentração de etanol era de 65,5 g/L, o consumo completo de substrato ocorreu na oitava hora e a concentração máxima de etanol no caldo foi de 73,4 g/L;
- arraste com início na quarta hora de fermentação: neste momento a concentração de etanol era de 58,4 g/L, o completo consumo de substrato ocorreu na sétima hora e a concentração máxima de etanol no caldo foi de 70,4 g/L;

- arraste com início na terceira hora de fermentação: neste momento a concentração de etanol era de 43,3 g/L, o completo consumo de substrato ocorreu na sétima hora e a concentração máxima de etanol no caldo foi de 68,0 g/L.

A partir desses ensaios, Sonogo (2016) constatou que a fermentação com início do arraste na terceira hora apresentou a maior produtividade em etanol em comparação com a fermentação convencional, este resultado foi justificado devido a minimização da inibição, que a partir de 40 g/L de etanol passa a ser mais significativa. Além disso, foi constatado pelo autor que a velocidade de consumo de substrato aumentou após o início do arraste, resultando em menor concentração de substrato residual.

Pinto (2014) avaliou a influência da vazão de gás (CO₂) e da temperatura em processo de arraste em vinho de levedurado e observou que o fator de arraste foi fortemente influenciado pela temperatura seguido da vazão de gás. A autora também verificou em um ensaio de fermentação extrativa em batelada alimentada, que com uma vazão específica de gás de 1 vvm foi possível reduzir a temperatura do meio fermentativo em 41% e as vazões volumétricas de água de resfriamento em 34%, gerando economia de energia e insumos nas torres de resfriamento.

Kumar *et al.* (2015) realizaram ensaios de fermentação a 50 °C com e sem arraste de etanol por N₂, utilizando a linhagem *Kluyveromyces sp.* IIPE453 e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Ao realizarem um comparativo entre estes ensaios, observaram que sem arraste a concentração de etanol no meio foi de 16,8 g/L, já no ensaio com arraste, a concentração de etanol foi de 1,5 g/L no biorreator e 56,3 g/L no condensado, assim foi possível recuperar aproximadamente 90% de etanol. Contudo, o rendimento e as produtividade volumétrica e específica em etanol foram semelhantes entre ambos ensaios. Os autores constataram que não houve efeito do arraste de etanol na fermentação. Porém, apontaram como vantagem do sistema a alta concentração de etanol no condensado, o que torna a recuperação do produto mais econômica do que no processo convencional.

Com o que foi exposto é possível dizer que a técnica do arraste gasoso é promissora, pois permite a remoção de parte do etanol produzido durante a fermentação, sendo que a quantidade remanescente reduz a inibição do metabolismo celular, permitindo a utilização de meios mais concentrados, aumentando a produtividade, reduzindo a temperatura do meio fermentativo e o custo com a recuperação do etanol.

Ao longo dessa revisão destacaram-se três formas de melhorar a produtividade e rendimento da produção de etanol de primeira geração: (i) emprego de leveduras

termotolerantes, (ii) introdução do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar e (iii) uso do processo de arraste de etanol. O emprego de linhagens termotolerantes *K. marxianus* além de proporcionarem melhor desempenho em locais de clima quente, economia de energia e restrição nas chances de contaminação devido a sua termotolerância, oferecem ainda como vantagem a possibilidade de se utilizar uma vasta gama de substratos. A utilização do sorgo sacarino no Brasil tem como objetivo complementar a produção de etanol na entressafra da cana-de-açúcar, mas em outras partes do mundo, o sorgo se destaca agronomicamente, por apresentar bom desenvolvimento em diferentes tipos de clima e solo e pelo fato de ser possível aproveitar todas as suas partes para a produção de etanol. Por fim, a extração de etanol pelo processo de arraste gasoso permite a remoção deste produto do caldo durante o processo fermentativo. Tal remoção reduz a inibição das células causada pela presença de altas concentrações de etanol, aumentando a produtividade do processo, permitindo a utilização de meios mais concentrados em açúcares e reduzindo o custo com a recuperação do produto.

3 Materiais e Métodos

Este trabalho foi dividido em três etapas: (i) propagação da linhagem termotolerante de *K. marxianus*, (ii) ensaios de fermentação em frascos agitados e (iii) ensaios de fermentação em biorreator. A propagação da linhagem de *K. marxianus* foi realizada em biorreator do tipo tanque agitado e aerado (5 L) e a massa celular obtida foi estocada em criotubos. Nos ensaios de fermentação em frascos agitados foram realizadas três análises: (i) na Análise 1 comparou-se o desempenho da linhagem termotolerante com o de leveduras comercial e industrial, (ii) na Análise 2 realizaram-se ensaios com a linhagem termotolerante em meio composto por sorgo sacarino, sorgo sacarino suplementado com nutrientes e sorgo sacarino suplementado em mistura com melão e (iii) na Análise 3 avaliou-se a temperatura ótima de fermentação da linhagem de *K. marxianus* por meio de ensaios de fermentação nas temperaturas de 36, 38, 40, 42 e 44 °C. Em biorreator do tipo pneumático de coluna de bolhas (2 L) foram realizados ensaios de fermentação no modo batelada convencional e no modo batelada com arraste de etanol empregando dióxido de carbono. Em todos os experimentos de fermentação foram calculados os principais parâmetros de processo (velocidade específica máxima de crescimento, coeficientes de rendimento e produtividades em etanol e glicerol). Realizou-se a modelagem matemática do processo empregando os dados experimentais dos ensaios realizados em frascos agitados (em diferentes temperaturas) e em biorreator e os parâmetros do modelo foram estimados empregando algoritmo genético com auxílio da função `optim_ga` do programa computacional do *Scilab* (versão 5.1.1).

3.1 Materiais

1) Microorganismos

Foi utilizada uma linhagem termotolerante de *K. marxianus* isolada de uma Usina do interior do Estado de São Paulo e gentilmente cedida pelo Dr. Anderson F. da Cunha (Departamento de Genética e Evolução, UFSCar) (fenotipagem e sequenciamento da linhagem encontram-se no Apêndice). Além desta, empregaram-se duas linhagens de *S. cerevisiae*, uma comercial de panificação (AB Brasil, Pederneiras, SP) e outra industrial (Y-904, AB Brasil, Pederneiras, SP), ambas na forma liofilizada.

2) Meios de cultura

A composição dos meios de cultura empregados nas etapas de crescimento, ativação e fermentação é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 - Composição dos meios de crescimento, ativação e fermentação.

Meio de crescimento (YPD)¹	Extrato de levedura (10 g/L); peptona (20 g/L); glicose (20 g/L)
Meio batelada (MB)²	Glicose (20 g/L), KH ₂ PO ₄ (8,8 g/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O (7,7 g/L), extrato de levedura (30 g/L) e ureia (4,8 g/L)
Meio batelada alimentada (MBA)²	Glicose (200 g/L), KH ₂ PO ₄ (8,8 g/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O (7,7 g/L), extrato de levedura (30 g/L) e ureia (4,8 g/L)
Meio de ativação (MA)³	Sacarose (110 g/L)*, KH ₂ PO ₄ (5,6 g/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O (1,4 g/L), extrato de levedura (6,8 g/L) e ureia (5,32 g/L)
Meio de fermentação 1 (MF1)³	Sacarose (180 g/L), KH ₂ PO ₄ (5,6 g/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O (1,4 g/L), extrato de levedura (6,8 g/L) e ureia (5,32 g/L)
Meio de fermentação 2 (MS)⁴	Sorgo sacarino (Silotec 20 [®] , Seprotect sementes)
Meio de fermentação 3 (MSS)⁴	Sorgo sacarino suplementado com: KH ₂ PO ₄ (5,6 g/L), MgSO ₄ ·7H ₂ O (1,4 g/L), extrato de levedura (6,8 g/L) e ureia (5,32 g/L)
Meio de fermentação 4 (MSM)⁵	Sorgo sacarino suplementado e melão (50%:50% v/v)

¹Fonseca *et al.* (2007); ²Falco *et al.* (2014), Sonogo (2016); ³Sonogo (2016); ⁴Silva *et al.* (2016); ⁵Melhor combinação dentre 75% melão+25% sorgo, 25% melão+75% sorgo e 50% melão+50% sorgo segundo Silva *et al.* (2016); *Eiadpum *et al.* (2012).

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos experimentais

1) Preparo da cultura estoque de *K. marxianus*

Objetivou-se iniciar os ensaios de fermentação com concentração celular em torno de 10 g/L. Para tal, preparou-se cultura estoque através de cultivo no modo batelada alimentada com perfil exponencial de alimentação do meio de cultivo. Após, as células foram preservadas em Ultrafreezer (-80 °C).

O inóculo do cultivo foi preparado em frascos agitados (volume de 500 mL, 50 mL de meio YPD, 40 °C, 250 rpm, 10 h) a partir de microrganismo conservado em placa de Petri (YPD+ágar sólido). Foram necessários 10 frascos de Erlenmeyers inoculados com uma alçada cada para começar o cultivo com aproximadamente 1 g/L de células.

O cultivo foi realizado em biorreator do tipo tanque agitado e aerado (5 L) modelo BioFlo 310 (New Brunswick Scientific™, Nova Jersey, EUA), a 40 °C. A primeira etapa do cultivo foi operada no modo batelada com volume inicial de 1,5 L, agitação de 360 rpm e duração de 3 h. Em seguida iniciou-se a operação em modo batelada alimentada até atingir o volume útil do biorreator. Durante esta etapa a velocidade de agitação foi controlada manualmente de modo a manter a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo em 30% de saturação. A vazão de ar foi mantida constante em 2 L/min e o pH foi controlado em 4,5 pela adição de solução de NaOH 5M ou de H₂SO₄ 5M. Para tentar manter um perfil exponencial de alimentação de meio suplementar, a cada meia hora aumentou-se a rotação da bomba de suplementação (modelo 323 Dz Watson Marlow) calculada a partir da Equação (4). Sendo que a vazão de alimentação foi obtida pela Equação (5), o volume de suspensão pela Equação (6), considerado uma taxa de diluição de 0,15 h⁻¹ e que com a bomba e a mangueira utilizadas foi possível obter uma vazão volumétrica de 0,27 mL/revolução.

$$R_b = \frac{F}{Q} \cdot f \quad (4)$$

$$F = D \cdot V \quad (5)$$

$$V = V_0 e^{Dt} \quad (6)$$

onde V (L) é o volume de suspensão no biorreator no instante t (h), V_0 (L) o volume de suspensão inicial, D a taxa de diluição (h^{-1}), F a vazão de alimentação (L/h), R_b a rotação da bomba (rpm), Q a vazão volumétrica da bomba em conjunto com a mangueira (mL/revolução) e f o fator de conversão das unidades.

A partir da etapa em batelada alimentada coletou-se a cada 1 h, 1 mL de amostra para análise das concentrações de açúcares e etanol e 1 mL para análise da concentração celular, a cada 2 h foi coletado 0,010 mL para análise da viabilidade celular. Durante o cultivo foi feita análise de glicose utilizando kit monitor de glicemia (Accu-chek[®] active Roche). Para tal, coletou-se 1 ml de suspensão, centrifugou-se (4000 rpm, 10 min, 4 °C) e realizou-se a diluição do sobrenadante de modo a conseguir realizar a leitura no kit de glicemia que possui leitura na faixa entre 0,1 a 6 g/L de glicose.

Ao final do cultivo, a suspensão foi centrifugada (4000 rpm, 20 min, 4 °C) e ressuspendida em 1 L de meio (meio de fermentação 1), a 20% v/v de glicerol (crioprotetor) e considerando 80% de umidade do creme de levedura (fração sólida coletada). Em seguida, a solução de células resultante foi distribuída completando o volume útil de criotubos de 5 mL e armazenada em ultrafreezer a -80°C.

2) Fermentações em frascos agitados

Nos cultivos com as linhagens comercial e industrial de *S. cerevisiae* não foi necessário o preparo de inóculo, mas para a completa dissolução da linhagem comercial no meio fermentativo, optou-se por esperar 15 min em agitação antes do início do ensaio. Já para a linhagem termotolerante foi necessário realizar procedimento de ativação, devido ao processo de congelamento dos criotubos fazer com que a viabilidade do microrganismo caísse bruscamente.

A ativação da linhagem termotolerante foi realizada em frascos agitados (40°C, 250 rpm, pH 4,5, 10 h) de 1 L com 100 mL de meio utilizando como pré-inóculo um criotubo. Após ativação a suspensão foi centrifugada (4000 rpm, 20 min, 4 °C) e ressuspendida no meio de fermentação. Para cada frasco utilizado na fermentação foi necessário preparar um frasco de inóculo. Todas as fermentações começaram com concentração celular de aproximadamente 10 g/L.

Com relação aos meios de fermentação, quando se utilizou meios compostos por sorgo sacarino foi necessário centrifugá-lo (4000 rpm, 20 min, 4 °C) e filtrá-lo em filtros qualitativos (tipo 1 Whatman 125 mm - Cat No 1001 125) para remoção dos sólidos em suspensão. O ajuste do pH dos meios de cultivo foi realizado com H₂SO₄ 1M.

Os ensaios de fermentação foram realizados em frascos agitados de 250 mL, com 100 mL de meio (200 rpm, pH 4,5, 9 h) em duplicata. Para análise do processo, a cada 1 h foi coletado 1 mL para análise das concentrações de açúcares, etanol e glicerol, 1 mL para análise da concentração celular e a cada 2 h foi coletado 0,010 mL para análise da viabilidade celular.

Primeiramente foram realizados ensaios de fermentação para verificação do potencial fermentativo da linhagem termotolerante (Análise 1). Para tal, foram realizados ensaios de fermentação com a linhagem termotolerante a 40 °C e com as linhagens comercial e industrial a 34 °C (temperatura ótima dessas cepas) e a 40 °C. Após, avaliou-se o desempenho da levedura termotolerante utilizando diferentes substratos (Análise 2). Nesta avaliação foram realizados ensaios de fermentação com sorgo sacarino, sorgo sacarino suplementado e sorgo sacarino suplementado com adição de melaço. Por fim, realizaram-se ensaios em diferentes temperaturas para avaliação da temperatura ótima de fermentação da linhagem termotolerante (Análise 3). Na Tabela 14 são apresentadas as condições dos ensaios de fermentação realizados.

Tabela 14 - Principais condições dos ensaios de fermentação realizados.

		Microrganismo	T (°C)
Análise 1	Meio de fermentação 1	Linhagens comercial, industrial e termotolerante	34, 40
Análise 2	Meios de fermentação 2, 3 e 4	Linhagem termotolerante	40
Análise 3	Meio de fermentação 1	Linhagem termotolerante	36, 38, 40, 42, 44

3) Fermentações em biorreator

As fermentações em biorreator foram realizadas com o objetivo de avaliar o desempenho da linhagem termotolerante em ensaios convencionais e com arraste de etanol por

dióxido de carbono. O biorreator utilizado foi do tipo pneumático de coluna de bolhas, encamisado e de volume útil de 2 L (BADINO *et al.*, 2007).

Os ensaios em batelada convencional foram realizados a 40 °C, pH 4,5, durante 9 h, utilizando o meio de fermentação 1. A agitação foi realizada por recirculação de meio, utilizando bomba peristáltica (modelo 323 Dz Watson Marlow), rotação de 300 rpm e para minimizar possíveis perdas de etanol por evaporação, acoplou-se um condensador (7 °C) ao biorreator.

Os ensaios em batelada com arraste de etanol por CO₂ foram realizados nas mesmas condições e com o mesmo meio de fermentação dos ensaios convencionais, exceto pela agitação e uso de condensador, que foram utilizados somente até o início da injeção de CO₂. Baseado nos ensaios em batelada convencional e no fato de que a inibição do metabolismo celular inicia-se em 30-40 g/L de etanol (valor típico de leveduras), optou-se por iniciar a alimentação da corrente de dióxido de carbono na terceira hora de fermentação. Durante estes ensaios o processo fermentativo foi analisado em diferentes vazões de CO₂, escolheu-se realizar ensaios a 2,5, 1,5 e 1,0 vvm, devido aos melhores resultados obtidos no estudo desenvolvido por Sonogo (2016), o qual empregou 2,0 vvm.

Com relação ao inóculo, este foi preparado da mesma forma do realizado nas fermentações em frascos agitados. Porém, para iniciar os ensaios com concentração celular de aproximadamente 10 g/L, foi necessário preparar o inóculo em 20 frascos de Erlenmeyers.

Para análise de todos os processos, a cada 1 h foi coletado 1 mL de amostra para análise das concentrações de açúcares, etanol e glicerol, 1 mL para análise da concentração celular e a cada 2 h foi coletado 0,010 mL para análise da viabilidade celular

3.2.2 Métodos de análise

1) Concentração celular

A análise da concentração celular foi realizada por método gravimétrico (método da massa seca). Para tal, membranas de nitrato de celulose (0,45 µm e 47 mm de diâmetro) foram previamente secas em estufa (60 °C, 24 horas) e pesadas. A suspensão (1 mL) foi filtrada com auxílio de bomba a vácuo e lavada com 10 mL de água destilada, em seguida as membranas

foram novamente colocadas na estufa (60 °C, 24 horas) e pesadas. A concentração celular foi então calculada pela Equação 7.

$$C_x = \frac{m_{seca}}{V_{amostra}} \quad (7)$$

onde C_x é a concentração celular (g/L), m_{seca} é a massa de células após a secagem (g) e $V_{amostra}$ é o volume da amostra retirada para secagem (L).

2) Viabilidade celular

A viabilidade celular foi quantificada por meio da contagem de células em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico (Olympus, BX50F-3). Para tal, foram realizadas diluições seriadas, primeiro em EDTA (0,1 mol/L) e após em solução de azul de metileno (0,02% de azul de metileno a 2% de citrato de sódio). Para a linhagem termotolerante e industrial a diluição foi de 90 vezes e para a linhagem comercial, 40 vezes. Após diluições, a suspensão foi colocada em descanso por 5 min para coloração das células. Em seguida, uma gota da solução foi colocada na câmara de Neubauer e com o auxílio do microscópio óptico (aumento de 20 vezes), foi possível realizar a contagem das células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas) (LEE *et al.*, 1981). A porcentagem de células viáveis foi calculada por meio da Equação 8.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{n^\circ \text{ de células viáveis}}{n^\circ \text{ total de células}} \times 100 \quad (8)$$

3) Concentração de açúcares, glicerol e etanol

As concentrações de sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717, Refratômetro W410). Utilizou-se a coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 µm, Waters) operada a 80 °C. Como fase eluente utilizou-se água ultrapura a uma vazão de 0,5 mL/min.

3.2.3 Métodos de cálculo

(1) Obtenção dos parâmetros cinéticos

Na análise dos processos fermentativos foram calculados a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$), os coeficientes de rendimento etanol-substrato ($Y_{E/S}$), glicerol-substrato ($Y_{G/S}$) e células-substrato ($Y_{X/S}$) e as produtividades volumétrica (P_v) e específica em etanol ($P_{E/X}$) e glicerol ($P_{G/X}$).

A velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi calculada na fase exponencial do crescimento celular. Plotou-se um gráfico de $\ln(C_X)$ versus o tempo e a velocidade específica máxima foi dada pelo coeficiente angular da reta (Equação 9).

$$\ln \frac{C_X}{C_{X0}} = \mu_{m\acute{a}x} t \quad (9)$$

onde C_X (g/L) é a concentração celular no instante de tempo t (h) e C_{X0} (g/L) é a concentração celular inicial.

Os coeficientes de rendimento células-substrato ($Y_{X/S}$), etanol-substrato ($Y_{E/S}$) e glicerol-substrato ($Y_{G/S}$), foram calculados pelas Equações 10, 11 e 12, respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{C_X V - C_{X0} V_0}{C_{S0} V_0 - C_S V} \quad (10)$$

$$Y_{E/S} = \frac{C_E V - C_{E0} V_0}{C_{S0} V_0 - C_S V} \quad (11)$$

$$Y_{G/S} = \frac{C_G V - C_{G0} V_0}{C_{S0} V_0 - C_S V} \quad (12)$$

onde C_E (g/L), C_G (g/L), C_S (g/L) e V (L) são respectivamente as concentrações de etanol, glicerol, substrato e volume de caldo no instante de tempo t (h) e C_{E0} (g/L), C_{G0} (g/L), C_{S0} (g/L) e V_0 (L) são as concentrações de etanol, glicerol, substrato e volume no início do processo fermentativo.

As produtividades volumétrica e específica em etanol e glicerol foram determinadas a partir das Equações 13, 14, 15 e 16.

$$P_v = \frac{C_{Ef}}{t_f} \quad (13)$$

$$P_{E/X} = \frac{C_{Ef}}{C_{Xf} t_f} \quad (14)$$

$$P_{v,G} = \frac{C_{Gf}}{t_f} \quad (15)$$

$$P_{G/X} = \frac{C_{Gf}}{C_{Xf} t_f} \quad (16)$$

onde P_v (gE/L.h) e $P_{E/X}$ (gE/gX.h) são respectivamente as produtividades volumétrica e específica em etanol, $P_{v,G}$ (gG/L.h) e $P_{G/X}$ (gG/gX.h) as produtividades volumétrica e específica em glicerol, C_{Ef} (g/L), C_{Gf} (g/L) e C_{Xf} (g/L) as concentrações de etanol, glicerol e de células no instante de tempo t_f (h) no qual os açúcares se esgotaram. Nos ensaios os quais os açúcares não se esgotaram, as produtividades foram calculadas com o C_{Ef} , C_{Gf} e C_{Xf} correspondentes a hora final do experimento.

(2) Modelagem matemática dos processos fermentativos

A modelagem dos processos fermentativos foi desenvolvida a partir de um modelo fenomenológico empregando cinética de Levenspiel. Os parâmetros do modelo cinético foram ajustados a partir dos dados experimentais empregando pacote de otimização baseado em algoritmo genético flexível (optim_ga) do *Scilab* (versão 5.5.1). As equações diferenciais resultantes dos balanços materiais foram resolvidas pelo algoritmo de Runge-Kutta.

- Fermentações convencionais em batelada

A modelagem do processo fermentativo no modo batelada convencional consistiu na resolução das equações resultantes do balanço de massa para as células, produto (etanol) e substrato (Equações 17, 18 e 20). Os balanços foram realizados considerando volume de meio reacional constante, sem morte celular e consumo de substrato para formação de células e de etanol, sendo a formação do produto associada ao crescimento celular. Para representar o crescimento celular utilizou-se o modelo cinético de Levenspiel (Equação 19) (LEVENSPIEL, 1980), considerando inibição somente pelo produto.

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_X C_X \quad (17)$$

onde μ_X (h^{-1}) é a velocidade específica de crescimento celular.

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \mu_X C_X \quad (18)$$

$$\mu_X = \mu_{máx} \cdot \frac{C_S}{(K_S + C_S)} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{E_{máx}}}\right)^n \quad (19)$$

onde K_S é a constante de saturação (g/L), $C_{E_{máx}}$ a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular (g/L) e n é uma constante adimensional, cujo valor foi assumido como sendo 1.

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_X C_X \quad (20)$$

-Fermentações em batelada com arraste de etanol por dióxido de carbono

A modelagem do processo fermentativo no modo batelada com arraste de etanol por CO_2 consistiu na resolução das equações resultantes do balanço de massa para as células, produto (etanol), substrato e massa total (Equações 21, 22, 23 e 24), considerando a variação de volume, a remoção de etanol e água do meio reacional, sendo que o modelo de remoção de etanol e água foi considerado como de primeira ordem (SONEGO, 2016).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu_X C_X - C_X \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (21)$$

onde V é o volume de suspensão (L).

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \mu_X C_X - C_E \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} - k_E C_E \quad (22)$$

onde k_E é a constante de velocidade de remoção de etanol (h^{-1}).

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_X C_X - C_S \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (23)$$

$$\frac{dV}{dt} = - \frac{(k_E C_E + k_A (\rho_A - C_E))V}{\rho_A} \quad (24)$$

onde k_A é a constante de velocidade de remoção de água (h^{-1}) e ρ_A a massa específica da água (g/L).

As constantes de velocidade de remoção de etanol e água foram determinadas a partir do estudo realizado por Moraes (2016). O trabalho foi realizado por meio de um planejamento composto central rotacional variando a vazão específica de CO₂ (1,0-4,0 vvm), a concentração inicial de etanol (30-60 g/L) e a temperatura (35-45 °C) de soluções hidroalcolólicas. Os valores de k_E e k_A (Tabela 15) foram então obtidos com os resultados do planejamento experimental (Equações (25) e (26)) e com as condições utilizadas nos ensaios de arraste deste trabalho.

$$k_A = 0,0034 + 0,00056\phi_{CO_2} - 0,00071C_{E0} + 0,00034T + 0,00034\phi_{CO_2}T \quad (27)$$

$$k_E = 0,11 + 0,023\phi_{CO_2} - 0,0070C_{E0}^2 + 0,013T + 0,013\phi_{CO_2}T \quad (28)$$

Tabela 15 - Valores de k_E e k_A empregados nas simulações dos processos com arraste de etanol por CO₂.

Vazão específica de CO ₂ (vvm)	2,5	1,5	1,0
k_E (h^{-1})	0,094	0,068	0,055
k_A (h^{-1})	0,0043	0,0037	0,0034

k_E : constante de velocidade de remoção de etanol; k_A : constante de velocidade de remoção de água

4 Resultados e Discussão

Foram realizados ensaios de fermentação em frascos agitados com linhagens comercial e industrial de *S. cerevisiae* e termotolerante de *K. marxianus* para comparação de seus desempenhos. Além de experimentos com a linhagem termotolerante em diferentes meios de fermentação (40 °C) e em diferentes temperaturas (MF1). Em biorreator pneumático tipo coluna de bolhas (2 L) foram realizadas fermentações no modo batelada e batelada com arraste de etanol por CO₂.

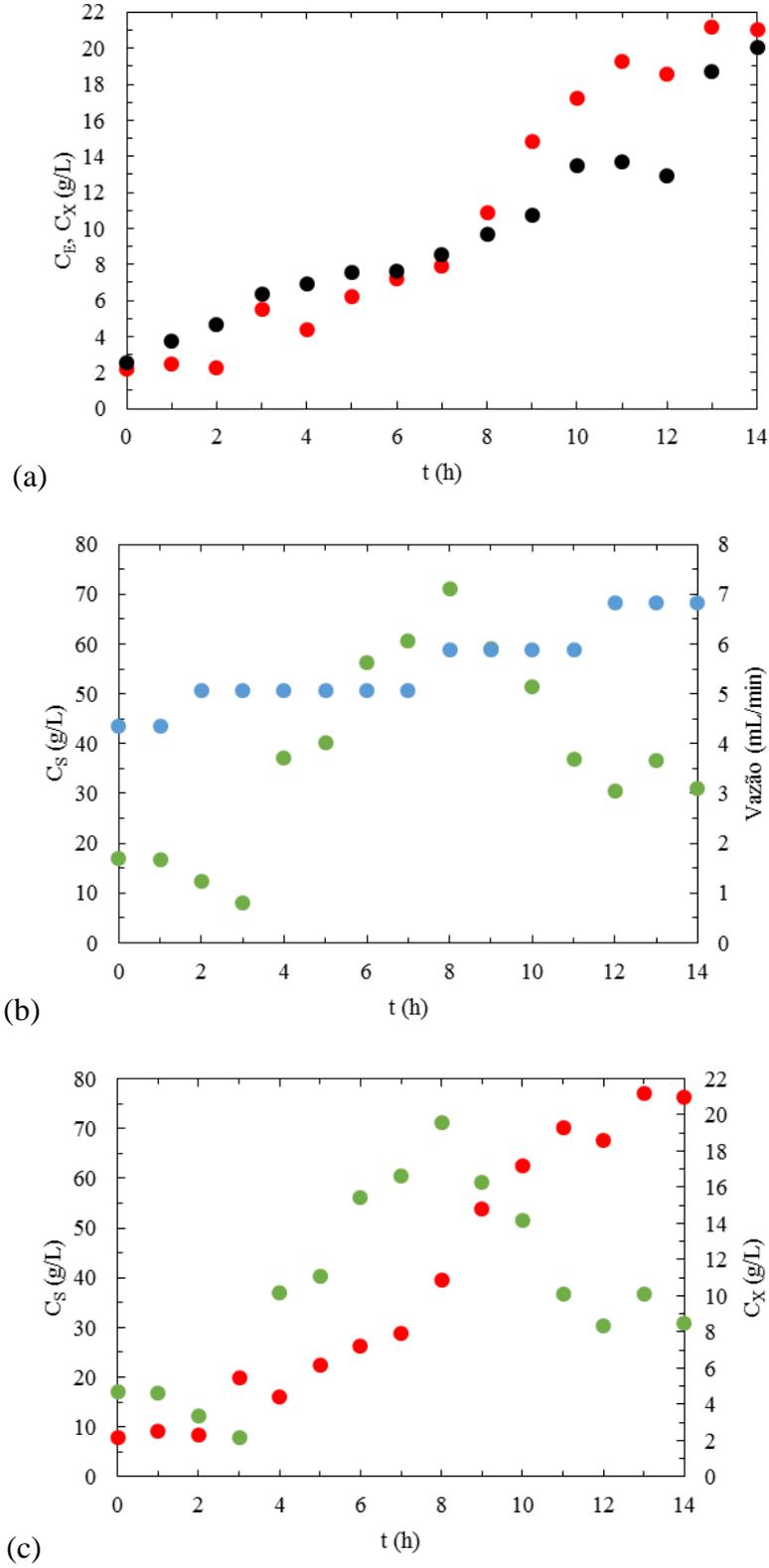
Para todos os ensaios realizados foram analisados o perfil de consumo de açúcares e formação de etanol. Foram determinados os coeficientes de rendimento substrato-célula e substrato-etanol, produtividades volumétrica e específica em etanol, bem como a velocidade específica máxima de crescimento celular. Também foi avaliada a produção de glicerol, uma vez que este é um dos produtos majoritários do processo fermentativo. Esta avaliação foi realizada através da determinação do coeficiente de rendimento substrato-glicerol e produtividade volumétrica e específica em glicerol. Durante os processos fermentativos acompanhou-se a viabilidade celular e por fim, realizou-se a modelagem e simulação dos processos fermentativos com a linhagem de *K. marxianus* em frascos agitados (diferentes temperaturas) e em biorreator (batelada convencional e com arraste de etanol). Os ensaios de fermentação foram realizados em duplicata e nas Figuras nas quais é possível observar o consumo de ART, formação de etanol e comportamento da viabilidade celular estão as barras de erro do desvio padrão da duplicata.

4.1 Preparo da cultura estoque da linhagem termotolerante de *K. marxianus*

O preparo da cultura estoque foi realizado por meio de cultivo no modo batelada alimentada. Na Figura 8 é possível observar o perfil de alimentação, do crescimento celular, da formação de etanol e do consumo de substrato durante o cultivo.

Figura 8 - Perfil da (a) concentração de etanol e de células, (b) vazão de alimentação e concentração de glicose e (c) concentração de glicose e de células -

C_E (●), C_X (●), vazão de alimentação (●) e C_S (●).



Observa-se na Figura 8 que não foi possível manter um perfil de alimentação exponencial, devido ao acúmulo de glicose no meio de cultivo. Dessa forma foi necessário interromper a alimentação por diversas vezes não sendo possível manter o cultivo até completar o volume total do reator (5 L). Ao final do experimento o reator foi alimentado até o volume de aproximadamente 3,5 L e a concentração final de células chegou a 21 g/L.

Com a massa celular obtida preparou-se criotubos com concentração celular de 74 g/L. Contudo, devido ao processo de congelamento, a viabilidade celular ficou baixa e foi necessário recorrer a um processo de reativação. Após este processo, obteve-se para o início dos ensaios de fermentação, concentração celular em torno de 10 g/L com viabilidade celular na faixa de 70-80%.

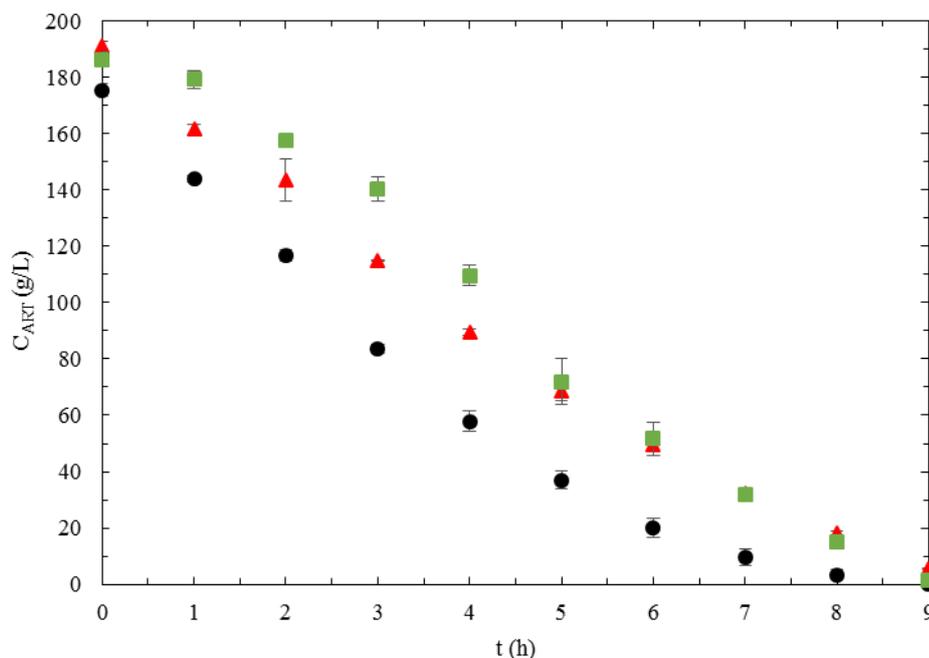
O controle de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo foi realizado manualmente através do aumento da frequência de agitação, no início do cultivo a velocidade de agitação empregada foi de 360 rpm, sendo que este valor foi gradativamente aumentado até chegar a 899 rpm ao final do experimento. Para manter a concentração de oxigênio dissolvido (OD) em 30% do valor de saturação, além da agitação, foi necessário aumentar a vazão de ar para 4,48 L/min.

4.2 Ensaios de fermentação em frascos agitados

4.2.1 Comparação entre o desempenho da linhagem termotolerante de *K. marxianus* e de linhagens convencionais de *S. cerevisiae*

Na análise do potencial de fermentação da linhagem termotolerante (40 °C) foram realizados ensaios de fermentação com cepa comercial e industrial de *S. cerevisiae* nas temperaturas de 34°C e 40 °C, utilizando o meio de fermentação MF1. Na Figura 9 observa-se o perfil de consumo de ART nos ensaios de fermentação a 40 °C para a linhagem termotolerante e a 34 °C para as cepas comercial e industrial.

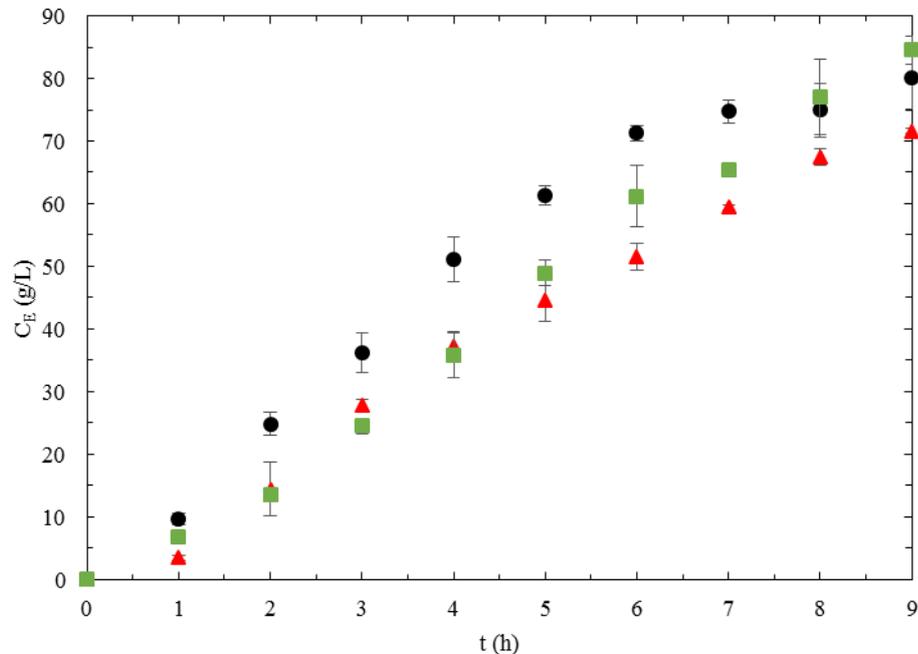
Figura 9 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* (▲) a 40 °C e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de *S. cerevisiae* a 34 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



Observa-se que nas horas iniciais da fermentação até a metade do processo o consumo de substrato pela linhagem industrial foi mais lento. Da metade do processo para o final, a linhagem termotolerante e industrial tiveram um perfil de consumo de substrato muito semelhante. Sendo que durante todo o processo o consumo de ART por parte da linhagem comercial foi o mais rápido. Por fim, é possível verificar que no processo com a linhagem comercial os açúcares se esgotaram entre a oitava e nona hora de fermentação, enquanto que para as linhagens termotolerante e industrial os açúcares se esgotaram em aproximadamente 9 horas.

Com relação à formação de etanol (Figura 10), no experimento com a linhagem comercial a formação do produto ocorreu de forma mais rápida até a sétima hora, sendo que a partir deste momento a produção foi maior no experimento que empregou a linhagem industrial. Nos experimentos com a linhagem termotolerante e industrial, observa-se que a formação de etanol ocorreu de forma semelhante até a quarta hora e a partir deste momento verificou-se maior produção de etanol pela linhagem industrial. Por fim, nota-se que a produção de etanol foi crescente pela linhagem industrial e termotolerante durante todo o processo e para a linhagem comercial o perfil de produção deixou de ser crescente a partir da sexta hora.

Figura 10 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* (▲) a 40 °C e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de *S. cerevisiae* a 34 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



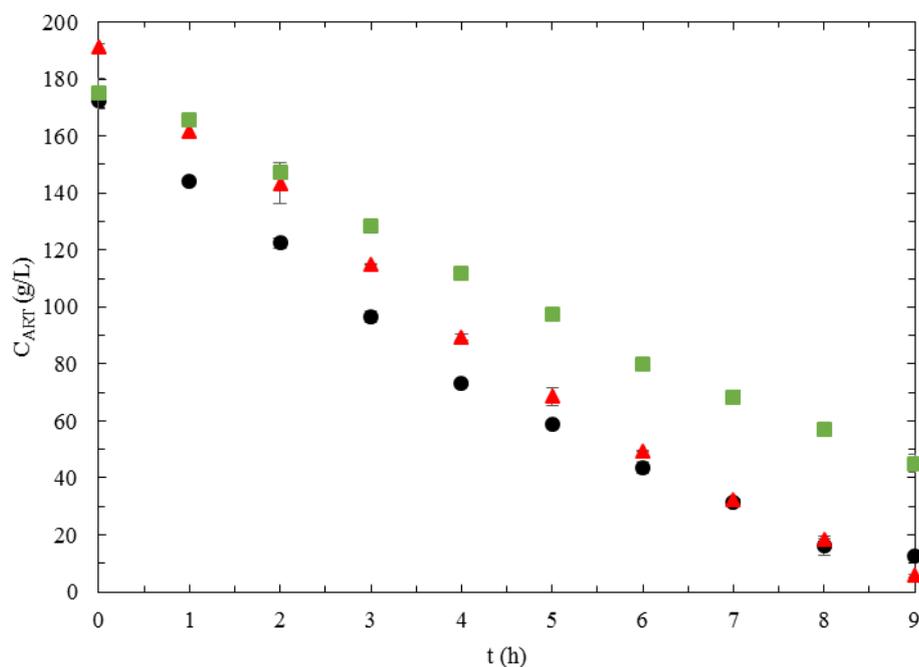
Analisando a produção de etanol máxima obtida pela linhagem termotolerante neste estudo (72 g/L), nota-se desempenho semelhante ao da linhagem *K. marxianus* GX-UN120 (modo batelada, 40 °C, meio com 150 g/L de glicose) (PANG *et al.*, 2010) e *K. marxianus* DMKU3-1042 (modo batelada, 40 °C, meio com 22% açúcares) (LIMTONG *et al.*, 2007) que produziram respectivamente 69 e 67,8 g/L de etanol. A linhagem em estudo teve desempenho superior à *K. marxianus* DBKKU Y-103 (modo batelada, 40 °C, 220 g/L de açúcares) (NUANPENG *et al.*, 2016) que produziu apenas 31,6 g/L de etanol.

Comparando a produção de etanol pelas três linhagens, verifica-se que a linhagem termotolerante produziu menos etanol do que as linhagens comercial e industrial, contudo este valor ainda está dentro do que se obtém nas usinas brasileiras (69-108 g/L) (AMORIM *et al.*, 2011). Durante o processo fermentativo industrial (30-35 °C) há perda de cerca de 1,5% de etanol que é arrastado pelo CO₂ e recuperado em torres de lavagem. Tal perda depende de fatores como a concentração de etanol no meio e a temperatura do processo (ELIA e SHINTAKU, 2009). Segundo Elia e Shintaku (2009) apud Formaggio e Finguerut (1990) com uma concentração de etanol variando de 59 a 108 g/L, a 34 °C a perda pode variar de 1,01 a 1,58% e a 40 °C, de 1,36 a 2,22%. Demonstrando que a perda de etanol pode ter influenciado e

mascarado a verdadeira produção de etanol, principalmente a 40 °C, uma vez que nesta temperatura a perda deste produto é maior.

Na Figura 11 observa-se o perfil de consumo de ART nos ensaios de fermentação à 40°C para as linhagens termotolerante, comercial e industrial.

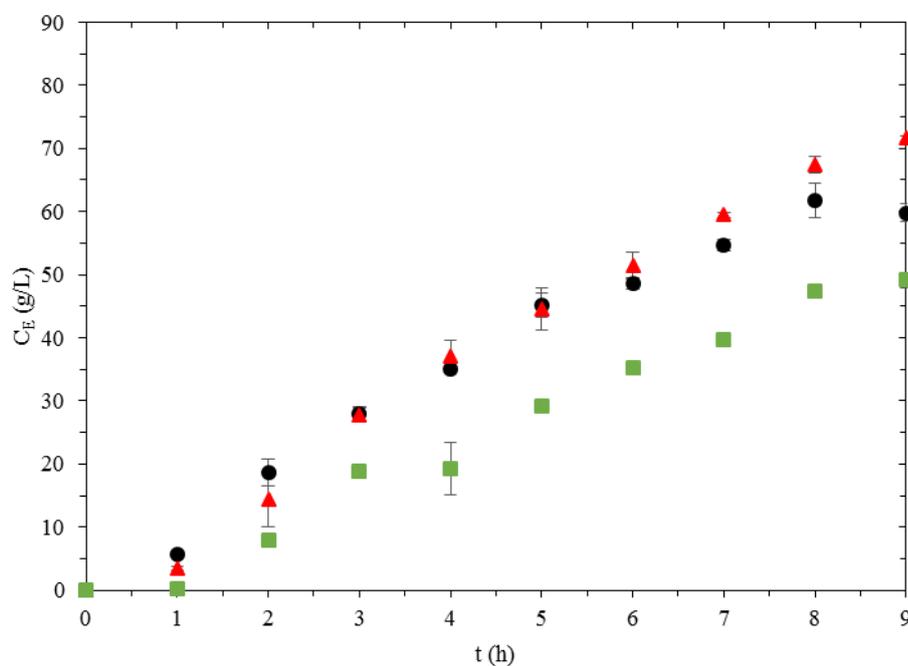
Figura 11 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* (▲) e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de *S. cerevisiae* a 40 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



Ao observar o consumo de substrato verifica-se que nas primeiras horas de fermentação as linhagens industrial e termotolerante apresentaram um perfil de consumo semelhante, contudo a partir da terceira hora nota-se que o consumo de açúcares pela linhagem industrial passou a ser o mais lento. Até a sexta hora de processo a linhagem comercial teve um consumo mais rápido, sendo que a partir deste momento o consumo foi semelhante ao da termotolerante. Ao final das 9 horas de fermentação, restaram 45 g/L de açúcares na fermentação utilizando a linhagem industrial, 12 g/L no cultivo utilizando a linhagem comercial e apenas 6 g/L no cultivo utilizando a linhagem termotolerante. Nota-se que a quantidade de açúcares na oitava e nova hora do processo utilizando a linhagem comercial ficou praticamente constante.

Em termos de formação de etanol (Figura 12), verifica-se que a linhagem industrial produziu este composto de forma mais lenta e em menor concentração durante todo o processo fermentativo. Observando a produção de etanol pela linhagem comercial e termotolerante, nota-se um perfil semelhante, exceto nas três últimas horas de processo, que a formação de etanol permaneceu crescente utilizando a linhagem termotolerante e tornou-se mais lenta com a linhagem comercial.

Figura 12 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* (▲) e pelas linhagens industrial (■) e comercial (●) de *S. cerevisiae* a 40 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



A partir da análise dos resultados obtidos é possível dizer que a linhagem industrial não conseguiu manter o desempenho fermentativo em temperaturas acima de sua temperatura ótima, o que foi comprovado tanto pelo consumo de substrato, que não foi total, quanto pela produção de etanol. O mesmo é possível aferir a respeito do desempenho da linhagem comercial, pois no processo a 34 °C os açúcares acabaram entre a 8ª e 9ª hora de fermentação sendo que a 40 °C o consumo não foi completo e ficou constante nas duas últimas horas do processo. Além disso a produção de etanol por esta linhagem foi menor a 40 °C. Por fim, como comentado na avaliação do processo fermentativo a 34 °C pelas linhagens convencionais e 40 °C pela linhagem termotolerante, também pode ter ocorrido evaporação de etanol nestes ensaios onde todos os processos fermentativos foram conduzidos a 40 °C.

Na Tabela 16 encontram-se os valores dos coeficientes de rendimento células-substrato e etanol-substrato, das produtividades específicas e volumétrica em etanol, bem como os valores das velocidades específicas máximas de crescimento celular para os experimentos acima analisados.

Tabela 16 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* e linhagens convencionais de *S. cerevisiae* com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	34 °C	34° C	40 °C	40 °C	40 °C
	industrial	comercial	industrial	comercial	termotolerante
$Y_{X/S}$ (gx/gs)	0,048	0,030	0,020	0,030	0,030
$Y_{E/S}$ (gE/gs)	0,46	0,46	0,38	0,37	0,39
$P_{E/X}$ (gE/gx·h)	0,45	0,54	0,36	0,38	0,52
P_V (gE/L·h)	9,39	8,90	5,46	6,65	7,96
μ_{max} (h ⁻¹)	0,15	0,17	0,040	0,074	0,14

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento células-substrato; $Y_{E/S}$: coeficiente de rendimento etanol-substrato; $P_{E/X}$: produtividade específica em etanol; P_V : produtividade volumétrica em etanol; μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento. Os coeficientes de rendimento e produtividades foram calculados com os dados da última hora de fermentação (9 h).

Comparando o desempenho da linhagem comercial e da industrial a 34 e 40 °C verifica-se que todos os parâmetros calculados diminuíram com o aumento na temperatura. Exceto o $Y_{X/S}$ da linhagem comercial que permaneceu o mesmo.

Já comparando o desempenho da linhagem termotolerante com o das linhagens industrial e comercial a 34 °C, observa-se que o $Y_{X/S}$ foi maior para a linhagem industrial e igual entre a comercial e termotolerante. O $Y_{E/S}$ apresentou valores iguais entre a linhagem industrial e comercial e superior ao da linhagem termotolerante. A produtividade específica foi maior para a linhagem comercial seguida termotolerante e industrial. A produtividade volumétrica da linhagem termotolerante foi menor do que o da linhagem comercial e industrial

e a velocidade específica máxima de crescimento celular da linhagem comercial foi maior do que os das linhagens termotolerante e industrial.

Verificando o desempenho da linhagem termotolerante, industrial e comercial a 40 °C, observa-se desempenho superior da linhagem termotolerante para todos os parâmetros calculados, exceto para o $Y_{X/S}$ que permaneceu semelhante ao da linhagem comercial. Destaca-se que entre as linhagens comercial e industrial o $Y_{X/S}$, as produtividades e o μ_{\max} foram maiores para a linhagem comercial.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 16 é possível verificar que as linhagens industrial e comercial não conseguiram manter os seus desempenhos na produção de etanol a 40 °C, o que também foi verificado nas análises dos perfis de consumo de açúcares e produção de etanol.

O desempenho de linhagens industriais já foi comparado ao de linhagens termotolerantes em temperaturas elevadas (>40 °C). Singh *et al.* (1998) obtiveram produtividades semelhantes entre uma linhagem termotolerante e industrial em processo com variação de temperatura de 28-42 °C, contudo não se utilizou sistema de resfriamento com a linhagem termotolerante, sendo necessário borrifar água no processo com linhagem industrial. Abdel-Fattah *et al.* (1999) observaram produtividade e rendimento inferiores de uma linhagem industrial em comparação com uma linhagem termotolerante e também precisaram utilizar sistema de resfriamento quando foi utilizada a linhagem industrial em temperaturas mais altas.

Além da avaliação do desempenho em etanol das linhagens estudadas, avaliou-se a formação de glicerol durante as fermentações. Os resultados podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* e linhagens convencionais de *S. cerevisiae* com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	34 °C	34° C	40 °C	40 °C	40 °C
	industrial	comercial	industrial	comercial	termotolerante
$Y_{G/S}$ (gG/gS)	0,052	0,051	0,057	0,054	0,029
$P_{G/X}$ (gG/gX·h)	0,052	0,060	0,055	0,055	0,040
$P_{V,G}$ (gG/L·h)	1,09	0,99	0,83	0,96	0,60

$Y_{G/S}$: coeficiente de rendimento glicerol-substrato; $P_{G/X}$: produtividade específica em glicerol; $P_{V,G}$: produtividade volumétrica em glicerol. Os parâmetros foram calculados com os dados da última hora de fermentação (9 h).

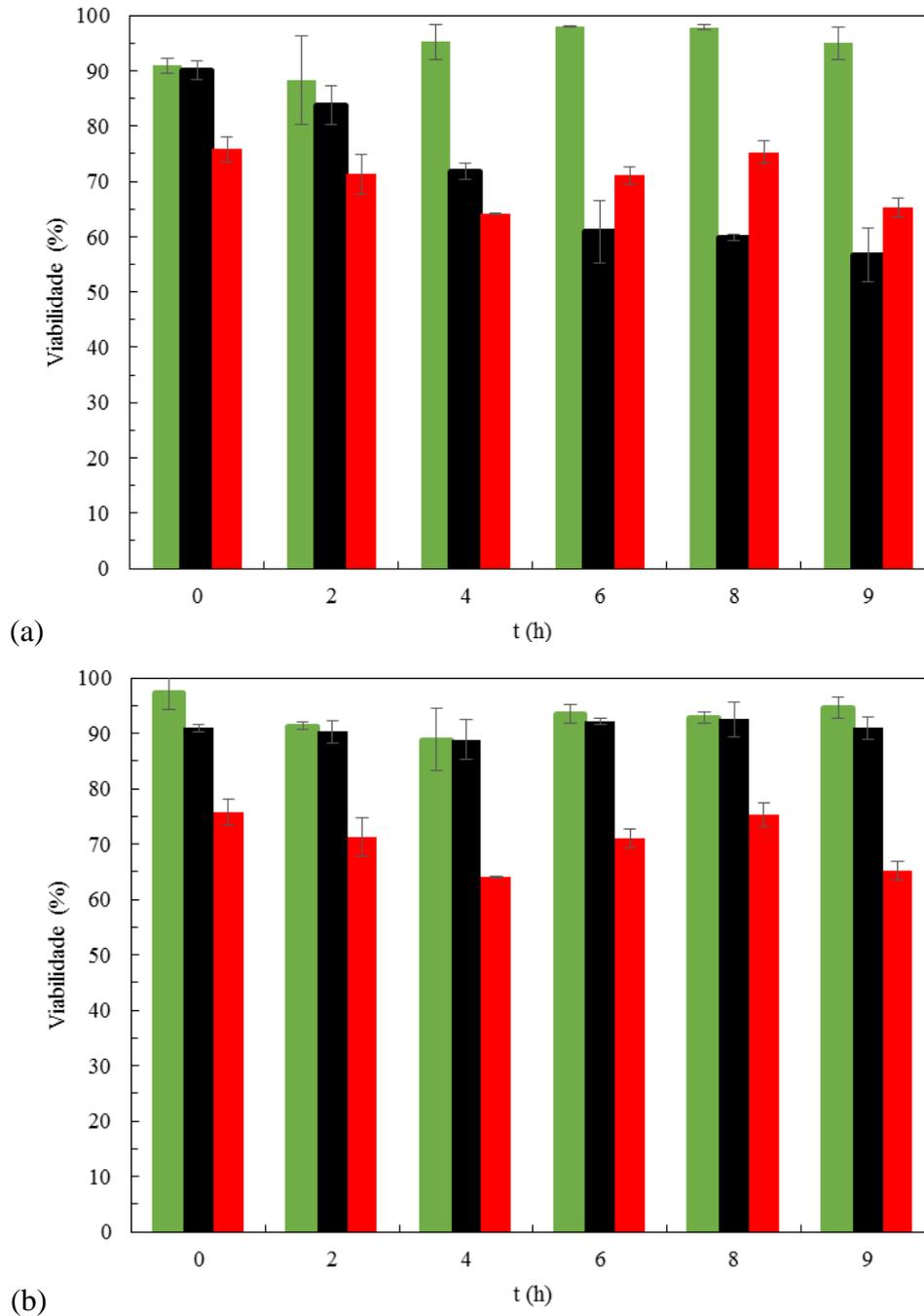
Analisando a produção de glicerol pela linhagem industrial e comercial a 34 e 40 °C, observa-se que o $Y_{G/S}$ aumentou com o aumento da temperatura. Entre as linhagens industrial e comercial a 34 °C, o $Y_{G/S}$ foi semelhante entre as duas, a produtividade volumétrica foi maior para a linhagem industrial e a produtividade específica para a comercial. A 40 °C o $Y_{G/S}$ foi maior para a linhagem industrial, a produtividade específica foi semelhante e a volumétrica foi maior para a linhagem comercial.

Comparando a produção de glicerol pela linhagem termotolerante e linhagens comercial e industrial, observa-se que em ambas temperaturas o coeficiente de rendimento e as produtividades foram menores para a linhagem termotolerante.

Durante a análise das fermentações a 40 °C levantou-se a hipótese de perda de etanol, o que pode ser notado ao somar os coeficientes de rendimento (células, etanol, glicerol e CO₂) dos ensaios realizados com as linhagens convencionais a 34 e 40 °C, pois na soma dos coeficientes dos ensaios com a linhagem industrial a 34 e 40 °C obteve-se valores de 100 e 82%, respectivamente e para a linhagem comercial 98 e 81%.

Por fim, ao longo os processos fermentativos fez-se análise da viabilidade celular. Na Figura 13 observa-se o resultado desta análise para as linhagens industrial (34 e 40 °C), comercial (34 e 40 °C) e termotolerante (40°C).

Figura 13 - Viabilidades das linhagens industrial (verde), comercial (preto) e termotolerante (vermelho) durante os processos fermentativos com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio MF1 nas temperaturas de (a) 34 °C para as linhagens industrial e comercial, 40 °C para a termotolerante e (b) 40 °C para todas as linhagens.



Avaliando a viabilidade da linhagem industrial em ambas temperaturas, verifica-se semelhança no seu comportamento, a 34 °C a viabilidade no início da fermentação era de 91% e no final chegou a 95%, a 40 °C a viabilidade inicial foi de 97% e a final de 95%. Observando a viabilidade da linhagem comercial a 34 e 40 °C, nota-se que a 34 °C houve

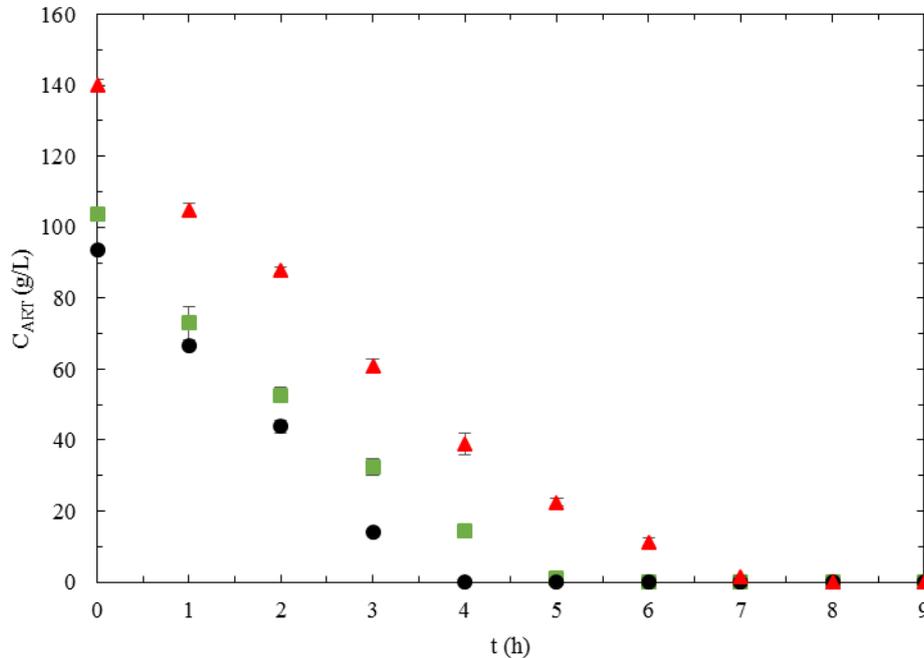
decréscimo da viabilidade com o tempo, provavelmente devido a toxicidade ao etanol. Este comportamento não foi observado a 40 °C, pois nesta temperatura a concentração de etanol foi baixa em comparação com a fermentação a 34 °C. Analisando o comportamento da linhagem termotolerante, verifica-se que esta começou com viabilidade inferior às demais devido ao inóculo ser preparado de forma diferente. Contudo teve bom desempenho e manteve a viabilidade durante o processo fermentativo.

A linhagem termotolerante de *K. marxianus* (40 °C) apresentou desempenho inferior ao da linhagem comercial (34 °C) e industrial (34 °C). Contudo em locais de clima quente tem-se dificuldade em controlar a temperatura do processo fermentativo, neste cenário, de temperaturas mais altas, as linhagens comercial (40 °C) e industrial (40 °C) tiveram o seu desempenho reduzido e inferior ao da linhagem termotolerante. Por isso, neste contexto, utilizar linhagens termotolerantes pode trazer incrementos ao processo.

4.2.2 Análise de diferentes meios de fermentação

Além da verificação do potencial fermentativo da linhagem termotolerante, foi analisada a sua aplicação em diferentes meios fermentativos na temperatura de 40 °C. Na Figura 14 observa-se o perfil de consumo dos açúcares em meios compostos por caldo de sorgo sacarino puro (MS), sorgo sacarino suplementado com nutrientes (MSS) e sorgo sacarino suplementado com adição de melação (MSM) (50%:50% v/v).

Figura 14 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processos fermentativos a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando como meio de fermentação sorgo (■), sorgo suplementado (●) e sorgo suplementado e melaço (▲).

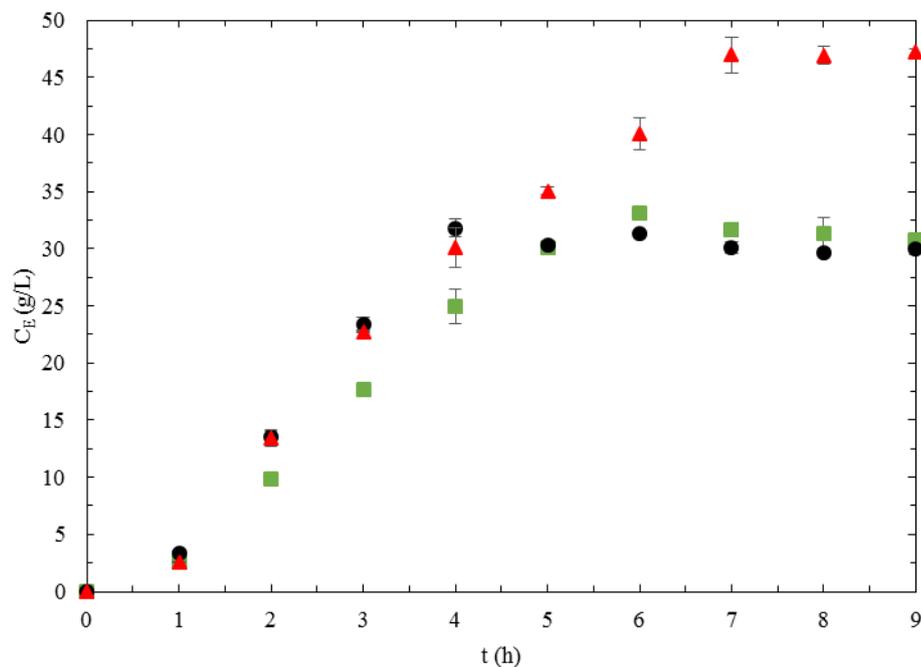


Comparando o desempenho da linhagem termotolerante em meios compostos somente pelo sorgo, verifica-se que no meio com sorgo suplementado o consumo de açúcares ocorreu de forma mais rápida do que no meio composto por sorgo sacarino puro.

Analisando o meio composto por sorgo e melaço, verifica-se que este meio possuía maior quantidade de açúcares (≈ 140 g/L ART) em relação aos meios compostos somente por sorgo (≈ 100 g/L ART), o que tornou possível estender a fermentação em mais horas.

O perfil de produção de etanol destes ensaios pode ser verificado na Figura 15. Observa-se que na primeira hora de fermentação a linhagem termotolerante teve um comportamento semelhante em todos os meios de fermentação. A partir deste momento, nota-se que no caldo com sorgo suplementado e sorgo suplementado com adição de melaço a formação de etanol se deu de forma mais rápida e semelhante até a quarta hora de processo. Analisando a concentração de etanol no final dos experimentos, observa-se que esta foi a mesma no meio composto por sorgo puro e sorgo suplementado. Já no ensaio com caldo de sorgo mais melaço, a produção de etanol se estendeu e foi possível obter uma maior concentração deste produto.

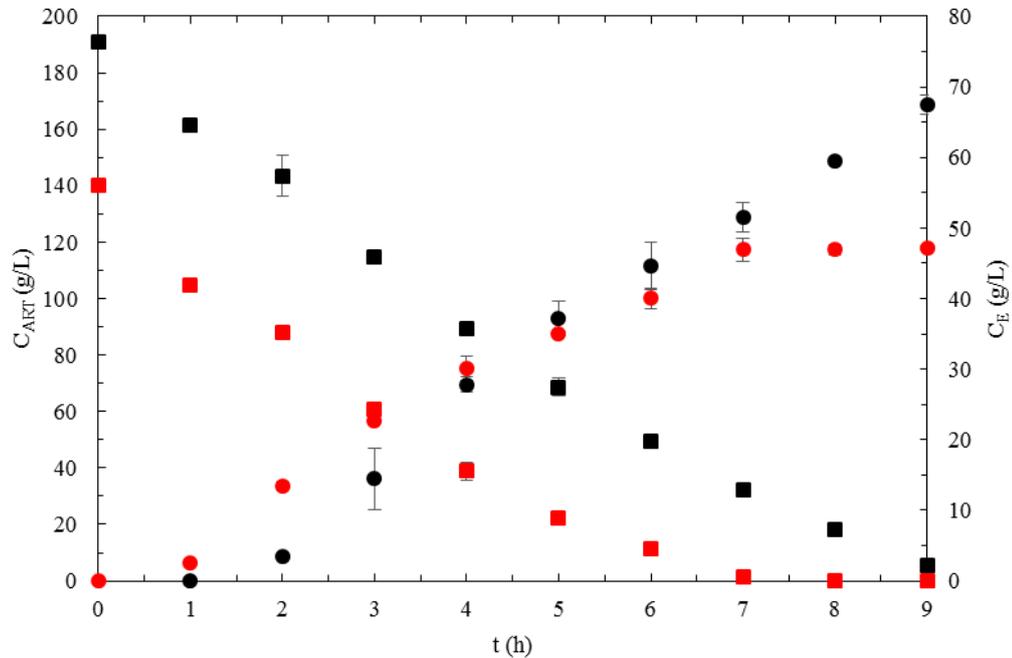
Figura 15 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processos fermentativos a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando como meio de fermentação sorgo (■), sorgo suplementado (●) e sorgo suplementado e melaço (▲).



A partir do exposto pode-se inferir que a linhagem termotolerante teve bom desempenho nos meios compostos por sorgo, pois a produção de etanol ocorreu enquanto haviam açúcares disponíveis no meio fermentativo. Com a adição de melaço foi possível aumentar a concentração de ART do meio e conseqüentemente a produção de etanol. Nuanpeng *et al.* (2016) também realizaram experimentos a 40 °C utilizando caldo de sorgo sacarino puro (220 g/L de açúcares) como meio de fermentação e linhagem termotolerante *K. marxianus* DBKKU Y-103. Como resultado obtiveram concentração máxima de etanol de 31,63 g/L, valor inferior ao obtido neste trabalho, o que pode ser atribuído a diferenças na capacidade fermentativa da linhagem deste trabalho e da DBKKU Y-103.

Analisando o desempenho da linhagem termotolerante no meio MF1 e no meio composto por sorgo sacarino suplementado com adição de melaço (Figura 16), nota-se um perfil semelhante de consumo de substrato em ambos os meios. Com relação à produção de etanol, no início do processo verifica-se que a formação deste metabólito se deu de forma mais rápida no meio MSM. Contudo, da metade do processo até o final, a produção de etanol foi mais rápida e maior no meio MF1.

Figura 16 - Formação de etanol (círculo) e consumo de substrato (quadrado) pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processos fermentativos a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando como meio de fermentação o meio MSM (vermelho) e o MF1 (preto).



Na Figura 16, observa-se o potencial do sorgo sacarino e do melaço como matérias-primas para produção de etanol, uma vez que o consumo de substrato e a formação de etanol se deram de forma semelhante ao meio MF1, sendo que a produção de etanol cessou devido ao esgotamento dos açúcares presentes no meio.

Os coeficientes de rendimento, produtividades específica e volumétrica em etanol, bem como a velocidade específica máxima de crescimento celular foram obtidos nos diferentes meios de fermentação. Os resultados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, em diferentes meios de fermentação.

	MS	MSS	MSM	MF1
$Y_{X/S}$ (gx/gs)	0,041	0,054	0,040	0,030
$Y_{E/S}$ (gE/gs)	0,32	0,34	0,34	0,39
$P_{E/X}$ (gE/gx·h)	0,41	0,52	0,35	0,52
P_V (gE/L·h)	5,52	7,95	5,86	7,96
μ_{max} (h ⁻¹)	0,093	0,12	0,11	0,14

S: sorgo sacarino; SS: sorgo sacarino suplementado; SM: sorgo e melação (1:1). $Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento células-substrato; $Y_{E/S}$: coeficiente de rendimento etanol-substrato; $P_{E/X}$: produtividade específica em etanol; P_V : produtividade volumétrica em etanol; μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento. Os coeficientes de rendimento e produtividades foram calculados quando os açúcares se esgotaram.

Observa-se na Tabela 18 que entre os meios compostos por sorgo o $Y_{X/S}$, as produtividades volumétrica, específica e o μ_{max} foram maiores no meio MSS, enquanto que o $Y_{E/S}$ foi maior e igual no meio MSS e MSM.

Analisando os processos fermentativos utilizando meios compostos pelo sorgo e o meio MF1, verifica-se que com o meio MF1 obteve-se os maiores valores para μ_{max} e $Y_{E/S}$, sendo que as produtividades volumétrica e específica foram semelhantes entre este meio e o MSS. Por fim, com o meio MF1 obteve-se o menor $Y_{X/S}$.

Comparando as produtividades dos meios MS e MSS, é possível justificar os melhores resultados do meio MSS devido aos suplementos utilizados neste meio. Entre as produtividades dos meios MSS e MSM, os melhores resultados para o meio MSS podem ser explicados devido ao excesso de nutrientes do meio MSM, que pode ter prejudicado o desempenho das células e também pelo fato da fermentação com o meio MSS ter terminado na quarta hora e com o meio MSM na oitava hora de processo.

Ao observar as produtividades específicas dos meios MSS e MF1, verifica-se valores semelhantes, o que pode ser justificado devido a massa celular produzida ter sido a mesma e a produção de etanol do meio MF1 (191 g/L ART) compensou o tempo de fermentação que foi de 9 h, enquanto que com o meio MSS (93 g/L ART) os açúcares se esgotaram na quarta hora de processo.

Analisando os dados da Tabela 18, verifica-se novamente o potencial do sorgo sacarino como meio de fermentação. Observando os dados obtidos para os meios compostos pelo sorgo, nota-se melhores resultados para o meio composto por sorgo suplementado. Contudo, como já analisado, o meio composto por sorgo suplementado e melaço teve um desempenho menor, provavelmente devido ao excesso de sais e ao maior tempo de fermentação, que foi estendido devido a maior quantidade de ART presentes no meio. De qualquer forma, avaliando de forma concomitante estes dados, o perfil de consumo de substrato e a formação de produto, observa-se que o meio com sorgo e melaço apresenta resultados promissores.

Comparando os resultados deste trabalho com os encontrados na literatura, observou-se que o desempenho do caldo de sorgo sacarino no processo fermentativo depende fortemente da concentração de açúcares encontrados no meio, o que impediu um melhor desempenho do caldo de sorgo neste trabalho por este apresentar ≈ 100 g/L de ART.

A produção de glicerol também foi analisada durante os ensaios de fermentação utilizando diferentes meios, os resultados encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* a 40 °C com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, em diferentes meios de fermentação.

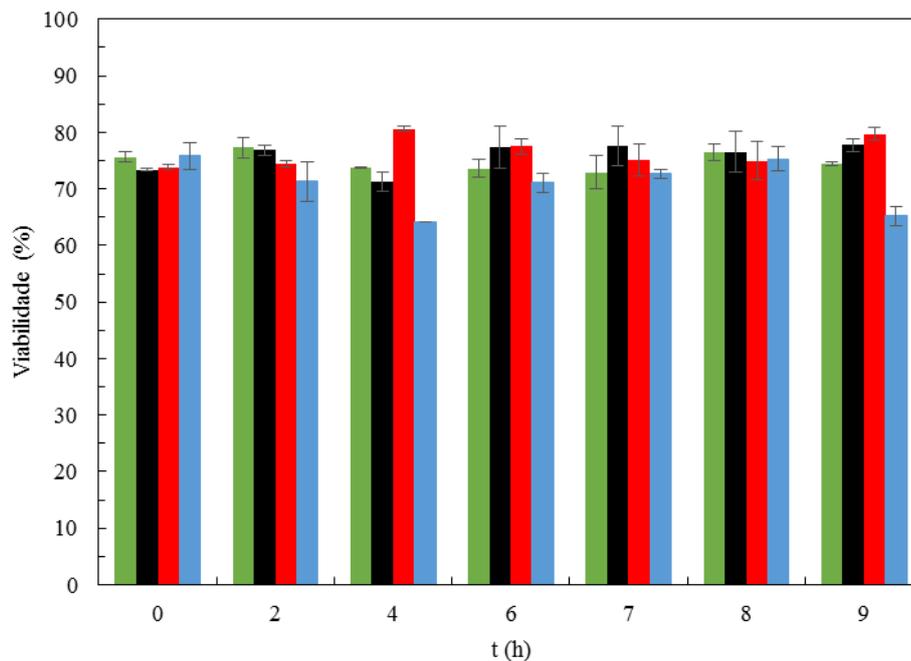
	MS	MSS	MSM	MF1
$Y_{G/S}$ (g/g)	0,047	0,052	0,049	0,029
$P_{G/X}$ (g/g·h)	0,061	0,079	0,051	0,040
$P_{V,G}$ (g/L·h)	0,82	1,21	0,85	0,60

$Y_{G/S}$: coeficiente de rendimento glicerol-substrato; $P_{G/X}$: produtividade específica em glicerol; $P_{V,G}$: produtividade volumétrica em glicerol. Os parâmetros foram calculados quando os açúcares se esgotaram.

Observa-se na Tabela 19 que a produção de glicerol foi maior nos meios compostos pelo sorgo e dentre estes o $Y_{G/S}$ e as produtividades foram maiores quando utilizou-se o meio composto por sorgo suplementado.

A viabilidade celular da linhagem termotolerante foi analisada durante os processos de fermentação utilizando meios compostos por sorgo sacarino e o meio MF1, o resultado pode ser observado na Figura 17.

Figura 17 - Viabilidade da linhagem termotolerante de *K. marxianus* a 40 °C durante processo fermentativo com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, em meios compostos por sorgo sacarino (verde), sorgo sacarino suplementado (preto), sorgo sacarino com melão (vermelho) e o MF1 (azul).

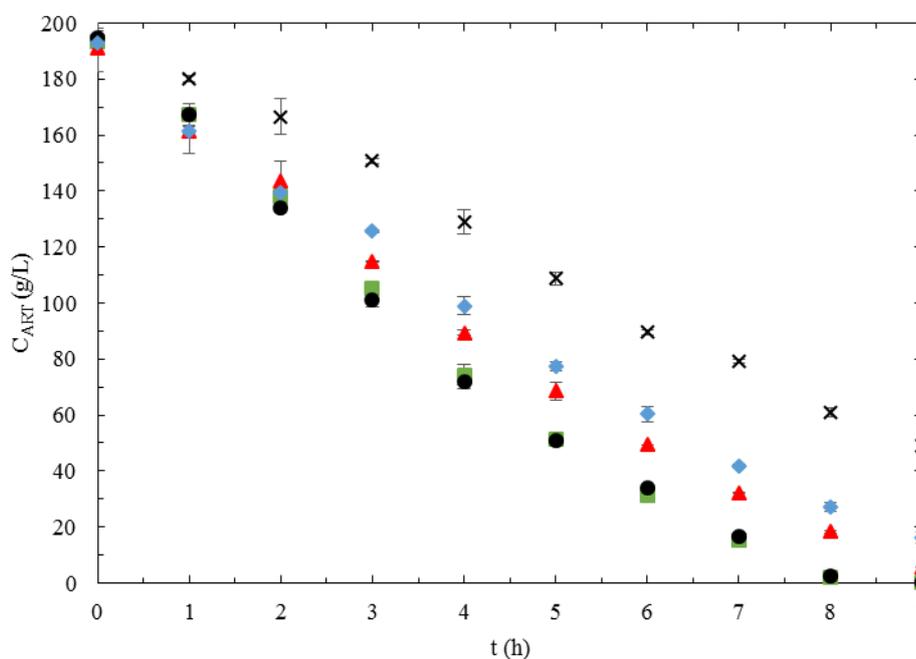


Na Figura 17, verifica-se que a linhagem de *K. marxianus* teve um comportamento muito semelhante em todos os meios que utilizaram sorgo. Porém, na última hora de fermentação utilizando o meio MF1, houve perda de viabilidade, este fato pode ser atribuído a maior produção de etanol utilizando este meio.

4.2.3 Análise da temperatura ótima de fermentação da linhagem termotolerante

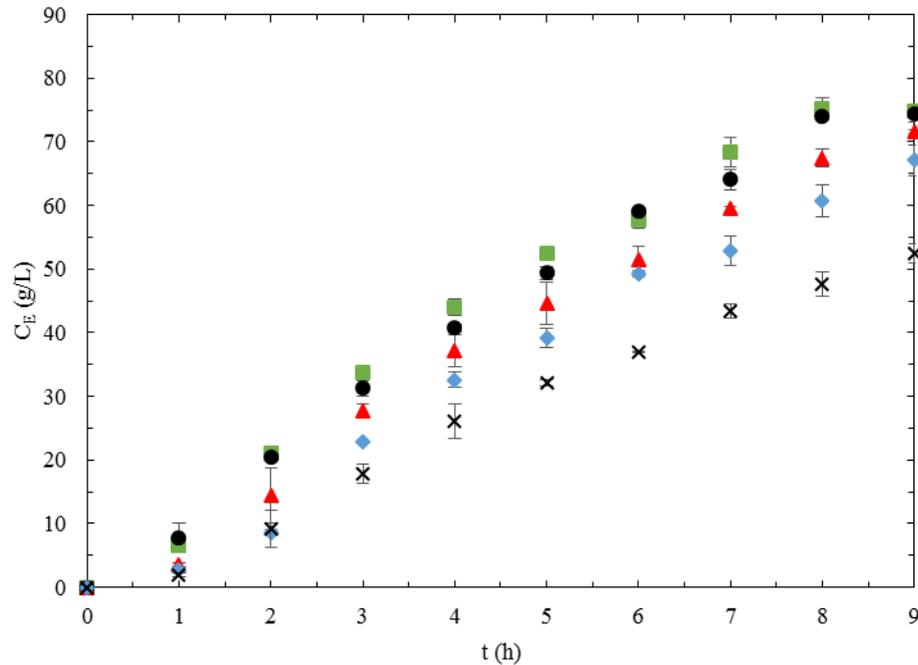
Para análise da temperatura ótima de fermentação da linhagem termotolerante foram realizados ensaios de fermentação em diferentes temperaturas (36, 38, 40, 42 e 44 °C) utilizando o meio MF1. Na Figura 18 observa-se o perfil de consumo de açúcares pela linhagem termotolerante durante estes ensaios.

Figura 18 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* nas temperaturas de 36 (■), 38 (●), 40 (▲), 42 (◆) e 44 °C (x) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



Na Figura 18 é possível verificar que a 36 e 38 °C o perfil de consumo dos açúcares foi semelhante e mais rápido durante todo o processo. A 40 e 42 °C o consumo foi semelhante até a segunda hora, sendo que a partir deste momento, a velocidade foi menor a 42 °C. A 44 °C o consumo de açúcares foi o mais lento. Observa-se ainda que a 36 e 38 °C, os açúcares se esgotaram entre a 8ª e 9ª hora de fermentação e a 40 °C, 42 e 44 °C restaram, respectivamente, 6, 16 e 49 g/L de ART. Estes comportamentos refletiram na produção de etanol (Figura 19) que foi semelhante e maior nas temperaturas de 36 e 38 °C e menor nas temperaturas de 40, 42 e 44 °C.

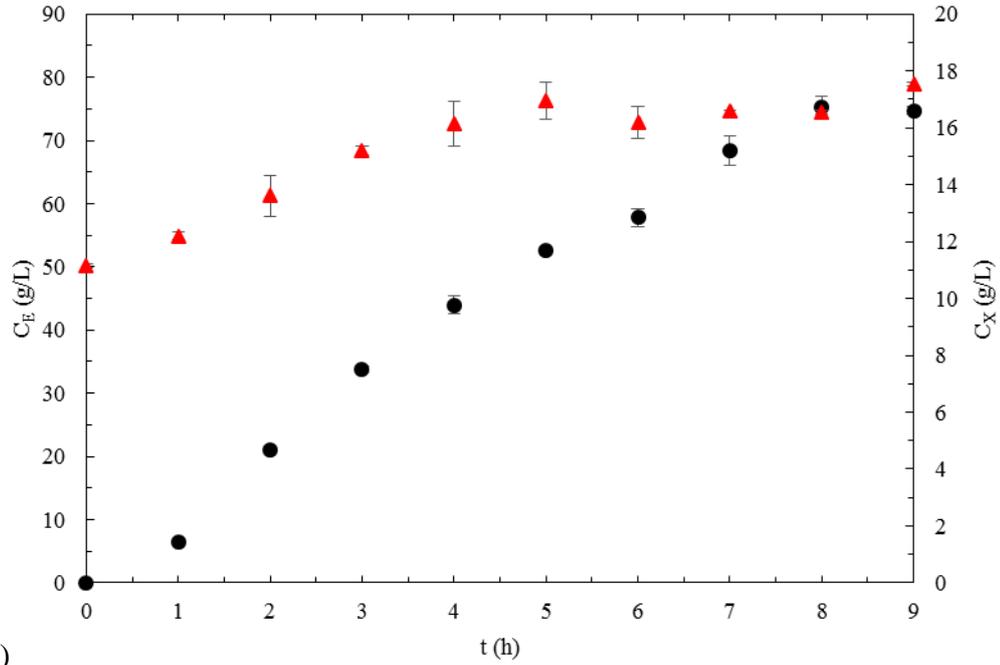
Figura 19 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* nas temperaturas de 36 (■), 38 (●), 40 (▲), 42 (◆) e 44 °C (x) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



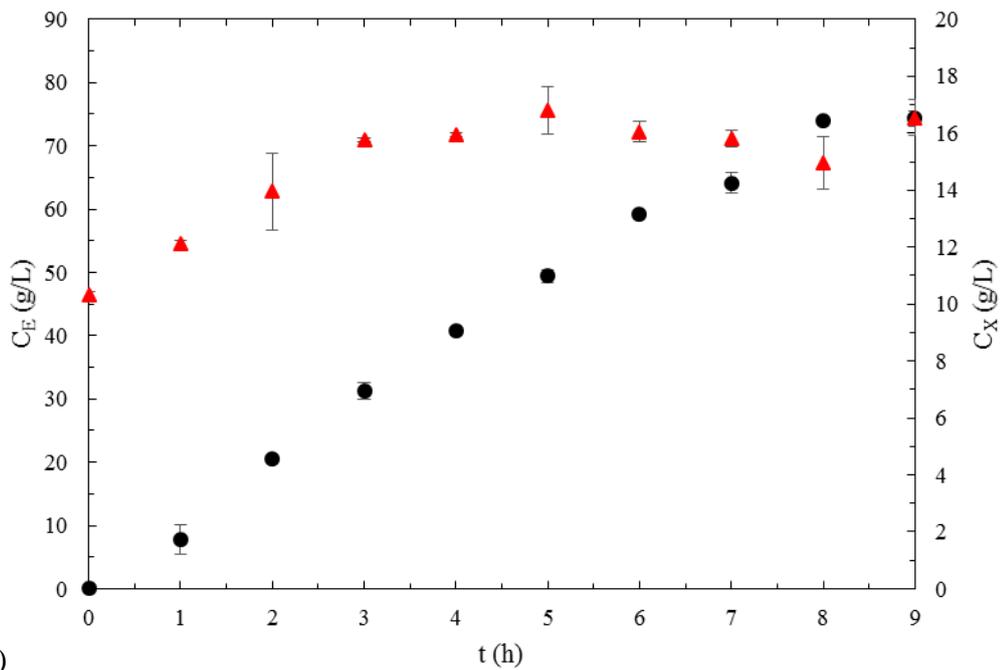
Verifica-se nas Figuras 18 e 19 que o aumento da temperatura influenciou a produção de etanol. As concentrações máximas de etanol obtidas em cada temperatura foram: 75 g/L (36 °C), 74 g/L (38 °C), 72 g/L (40 °C), 67 g/L (42 °C) e 52 g/L (44 °C). Este fato pode ser explicado devido à evaporação de etanol, que pode ter sido maior nas temperaturas mais altas e/ou devido ao efeito negativo de altas temperaturas no crescimento e processos metabólicos das células. Já foi reportado na literatura que altas temperaturas modificam a fluidez da membrana plasmática e reduzem a sua eficiência como barreira semipermeável. Esta barreira é a responsável pela passagem de cofatores e coenzimas necessárias para a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e na produção de etanol (WALKER, 1994). Além disso, altas temperaturas causam a desnaturação de proteínas celulares, causando a redução do crescimento celular e do metabolismo fermentativo (ROUKAS, 1994). A redução do crescimento celular também pode ser atribuída ao acúmulo de etanol dentro das células o que pode modificar a estrutura da membrana celular (TORIJA *et al.*, 2003). A redução do crescimento celular com a temperatura foi observada neste trabalho (Figura 20). Verificou-se que quanto maior a temperatura, menor foi a concentração de etanol onde o crescimento celular cessou. A 36 °C o crescimento celular cessou com uma concentração de etanol de 53 g/L, a 38

°C com uma concentração de 41 g/L, a 40 °C com 37 g/L, a 42 °C com 33 g/L e a 44 com 18 g/L de etanol.

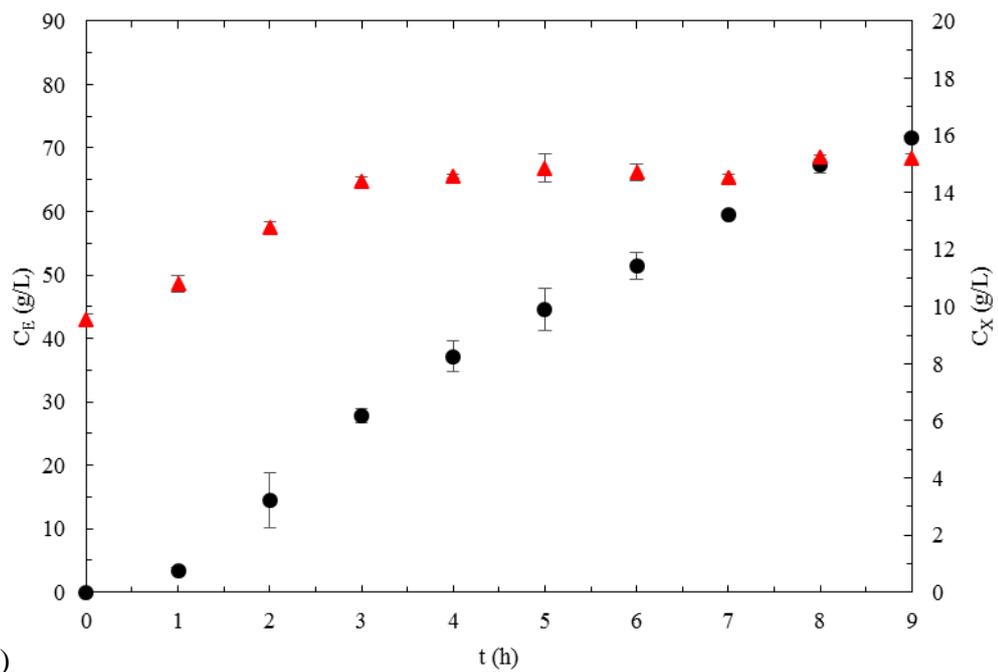
Figura 20 - Crescimento celular (▲) e formação de etanol (●) durante processos de fermentação nas temperaturas de 36 °C (a), 38 °C (b), 40 °C (c), 42 °C (d) e 44 °C (e) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



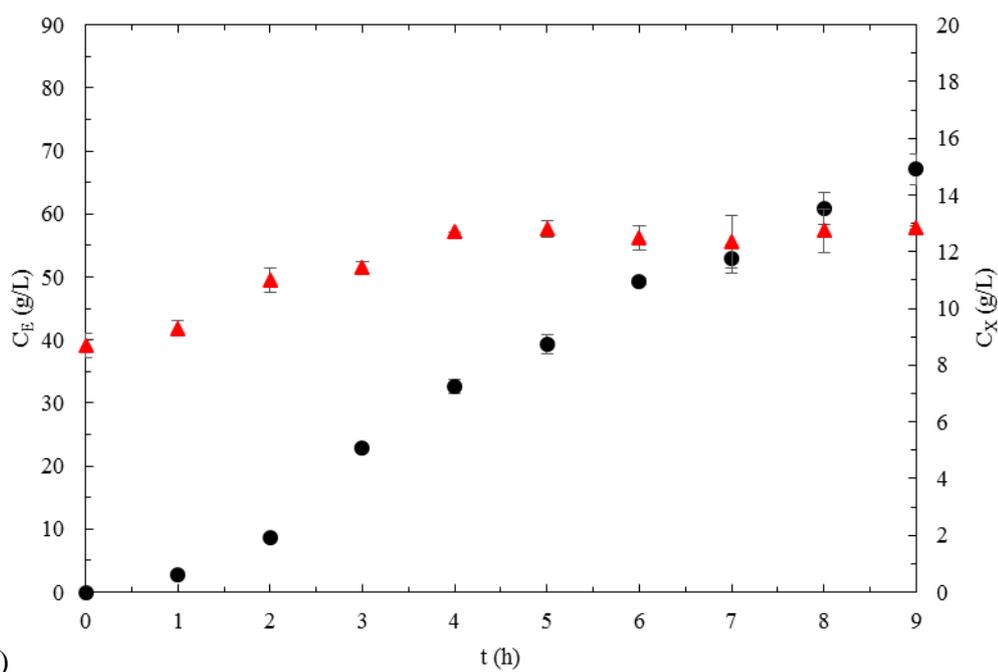
(a)



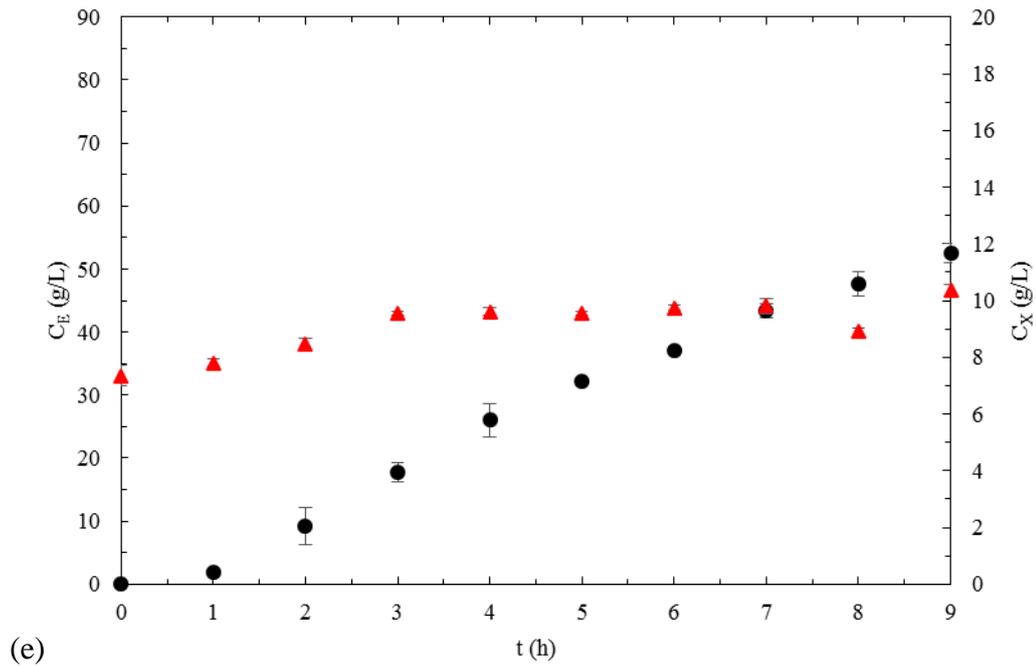
(b)



(c)



(d)



Na Tabela 20 apresentam-se os valores obtidos para os coeficientes de rendimento células-substrato e etanol-substrato, bem como os valores de velocidade específica máxima de crescimento celular, produtividades volumétrica e específica em etanol dos ensaios em diferentes temperaturas.

Tabela 20 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* em diferentes temperaturas com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	44 °C
Y_{X/S} (gx/gs)	0,033	0,032	0,030	0,023	0,019
Y_{E/S} (gE/gS)	0,39	0,38	0,39	0,38	0,34
P_{E/X} (gE/gX·h)	0,47	0,50	0,52	0,58	0,56
P_V (gE/L·h)	8,31	8,26	7,96	7,46	5,83

(Cont.) Tabela 20 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* em diferentes temperaturas com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	44 °C
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,096	0,14	0,14	0,097	0,087

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento células-substrato; $Y_{E/S}$: coeficiente de rendimento etanol-substrato; $P_{E/X}$: produtividade específica em etanol; P_V : produtividade volumétrica em etanol; μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento. Os coeficientes de rendimento e produtividades foram calculados com os dados da última hora de fermentação (9 h).

Observando os valores de $Y_{X/S}$ verifica-se que este coeficiente diminuiu com o aumento da temperatura. O $Y_{E/S}$ foi semelhante na faixa de 36-42 °C, diferenciando-se significativamente somente na temperatura de 44 °C.

Em termos de produtividade específica verifica-se que houve um aumento dos valores com o aumento da temperatura, isso porque com o aumento da temperatura a concentração celular e a produção de etanol diminuíram. Analisando a produtividade volumétrica observou-se que esta diminuiu com o aumento da temperatura. O mesmo foi observado por Limtong *et al.* (2007), ao aumentar a temperatura de 37 para 40 °C em processo fermentativo utilizando a linhagem *K. marxianus* DMKU3-1042 e por Nuanpeng *et al.* (2016) que realizaram ensaios fermentativos em diferentes temperaturas (30, 37, 40, 42 e 45 °C) com a linhagem termotolerante *S. cerevisiae* DBKKU Y-53.

Por fim, a velocidade específica máxima de crescimento celular foi maior e igual nas temperaturas de 38 e 40 °C, seguido das temperaturas de 42, 36 e 44 °C.

Além da formação de etanol em diferentes temperaturas de fermentação, analisou-se também a produção de glicerol. Na Tabela 21 é possível verificar os resultados desta análise.

Tabela 21 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* em diferentes temperaturas com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	44 °C
Y_{G/S} (g/g)	0,032	0,031	0,029	0,032	0,029
P_{G/X} (g/g·h)	0,040	0,041	0,040	0,049	0,049
P_{V,G} (g/L·h)	0,70	0,67	0,60	0,63	0,51

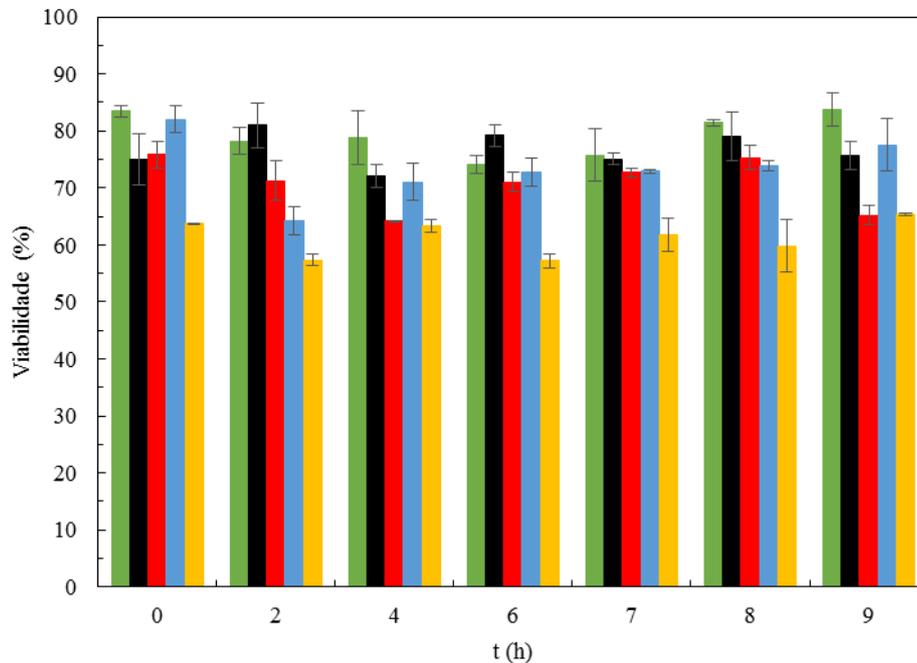
Y_{G/S}: coeficiente de rendimento glicerol-substrato; P_{G/X}: produtividade específica em glicerol; P_{V,G}: produtividade volumétrica em glicerol. Os parâmetros foram calculados com os dados da última hora de fermentação (9 h).

Observa-se na Tabela 21 que não houve uma tendência para o Y_{G/S}, sendo que as produtividades específicas foram menores nas temperaturas de 36-40 °C e produtividade volumétrica diminuiu com o aumento da temperatura.

Como já comentado na Análise 1, há possibilidade de maior evaporação de etanol durante os processos fermentativos em temperaturas mais altas. Ao somar os coeficientes de rendimento dos principais produtos gerados durante a fermentação (células, etanol, glicerol e CO₂) verificou-se que os valores diminuiriam com o aumento da temperatura, sendo que a 36 °C o somatório foi 83% e a 44 °C, 71%.

Durante os processos fermentativos, avaliou-se a viabilidade celular nas diferentes temperaturas de fermentação (36, 38, 40, 42 e 44 °C), o resultado pode ser analisado na Figura 21.

Figura 21 - Viabilidade da linhagem termotolerante durante processo fermentativo nas temperaturas de 36 (verde), 38 (preto), 40 (vermelho), 42 (azul) e 44 °C (amarelo) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



Na Figura 21 é possível verificar que o perfil de viabilidade manteve-se semelhante ao longo do processo fermentativo em todas as temperaturas.

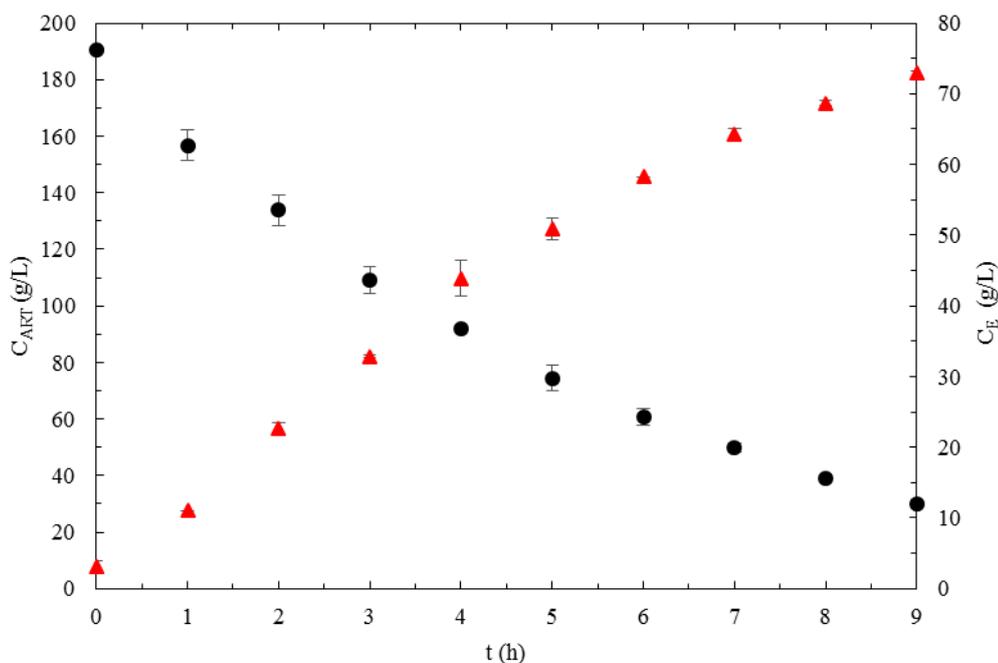
Ao avaliar os processos fermentativos com a linhagem de *K. marxianus* em diferentes temperaturas tem-se dificuldade na escolha da temperatura ideal, pois a produtividade volumétrica diminuiu com o aumento da temperatura e o $Y_{E/S}$ foi semelhante entre 36-42 °C. Hipóteses para este comportamento seria a influência negativa de altas temperaturas no metabolismo celular e/ou perda de etanol para o ambiente. Portanto, optou-se por realizar os ensaios seguintes a 40 °C, por esta ser uma temperatura alta, porém intermediária na faixa avaliada. Além de proporcionar redução nas chances de contaminação do processo por microrganismos mesófilos.

4.3 Ensaio de fermentação em biorreator

4.3.1 Ensaio de fermentação em biorreator no modo batelada convencional

Após a realização dos ensaios de fermentação em frascos agitados, realizou-se experimento em biorreator (2 L) no modo batelada convencional a 40 °C utilizando o meio de fermentação MF1 e a linhagem de *K. marxianus*. Na Figura 22 é possível verificar o perfil de consumo de substrato e formação de etanol durante este ensaio.

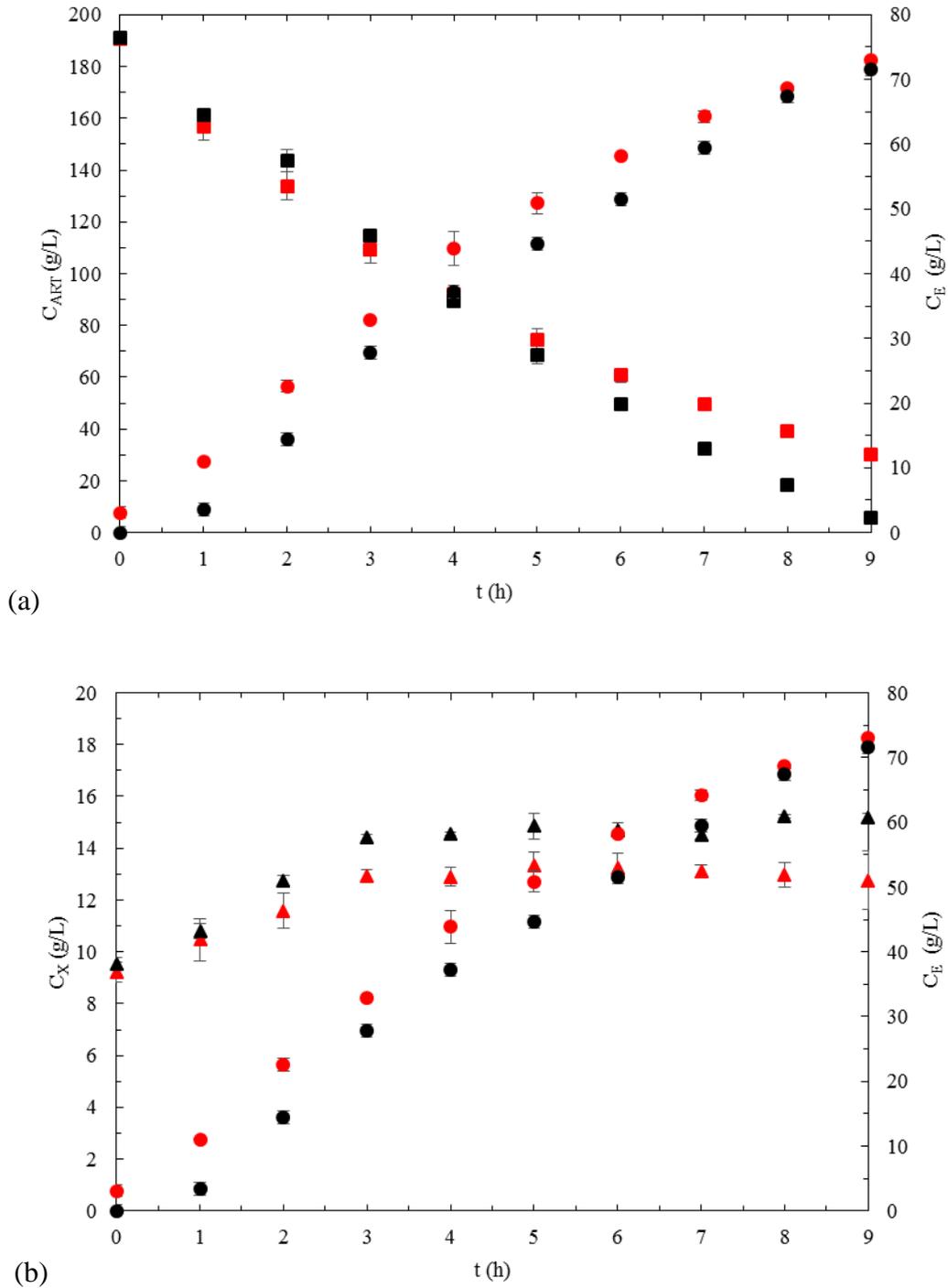
Figura 22 - Consumo de ART (●) e formação de etanol (▲) pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em processo fermentativo em biorreator, a 40 °C, com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.



Observa-se na Figura 22 que com 9 horas de fermentação a linhagem de *K. marxianus* produziu 73 g/L de etanol e não consumiu todos os açúcares disponíveis no caldo de fermentação, restando 30 g/L de ART no final do processo.

Na análise da temperatura ótima de fermentação realizada em frascos agitados, fez-se um ensaio nas mesmas condições deste experimento. Os dados de ambos foram confrontados e na Figura 23 é possível verificar o perfil de consumo de ART, crescimento celular e formação de etanol.

Figura 23 - (a) Concentração de ART (quadrado) e de etanol (círculo), bem como (b) crescimento celular (triângulo) e formação de etanol nos ensaios fermentativos com *K. marxianus* a 40 °C em frascos agitados (preto) e em biorreator (vermelho) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio MF1.



Observa-se na Figura 23 que até a quinta hora de experimento o consumo de ART foi semelhante em ambos ensaios e a partir deste momento o consumo passou a ser mais lento no ensaio em biorreator. Com relação à velocidade de produção de etanol, verifica-se que

esta foi maior no ensaio em biorreator até a sétima hora, sendo que nas duas últimas horas de processo a velocidade de produção foi semelhante a do ensaio realizado em frascos agitados. Verificando o crescimento celular durante estas fermentações constatou-se que no ensaio em frascos agitados o crescimento da linhagem termotolerante foi maior do que em biorreator, o que pode ter sido consequência da maior oxigenação nos frascos agitados e/ou devido a inibição por etanol, já que em biorreator a concentração de etanol foi maior em grande parte do experimento.

Na Tabela 22 encontram-se os valores dos coeficientes de rendimento células-substrato e etanol-substrato, bem como os valores de velocidade específica máxima de crescimento celular, produtividades volumétrica e específica em etanol dos ensaios em frascos agitados e em biorreator.

Tabela 22 - Coeficientes de rendimento, produtividades em etanol e velocidade específica máxima de crescimento celular dos processos fermentativos a 40 °C empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* em frascos agitados e em biorreator com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	$Y_{X/S}$ (gx/gs)	$Y_{E/S}$ (gE/gs)	$P_{E/X}$ (gE/gx·h)	P_V (gE/L·h)	μ_{max} (h ⁻¹)
Frascos agitados	0,030	0,39	0,52	7,96	0,14
Biorreator	0,022	0,44	0,64	8,11	0,11

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento células-substrato; $Y_{E/S}$: coeficiente de rendimento etanol-substrato; $P_{E/X}$: produtividade específica em etanol; P_V : produtividade volumétrica em etanol; μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento. Os coeficientes de rendimento e produtividades foram calculados com os dados da última hora de fermentação (9 h).

Verifica-se na Tabela 22 que os valores de $Y_{X/S}$ e o μ_{max} foram maiores no cultivo realizado em frascos agitados, enquanto que os valores de $Y_{E/S}$ e das produtividades foram maiores no cultivo em biorreator. Observa-se com estes dados que na fermentação em frascos agitados o crescimento celular foi favorecido como consequência de um ambiente com maior oxigenação. Em biorreator o acúmulo de etanol foi a favorecido possivelmente devido ao uso de condensador durante o processo fermentativo.

A produção de glicerol também foi avaliada no processo de fermentação em biorreator. Na Tabela 23 são apresentados os valores de coeficiente de rendimento e

produtividades em glicerol do ensaio em biorreator em comparação com os ensaios realizados em frascos agitados.

Tabela 23 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos a 40 °C empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus* em frascos agitados e em biorreator com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

	$Y_{G/S}$ (gx/gS)	$P_{G/X}$ (gG/gx·h)	$P_{V,G}$ (gG/L·h)
Frascos agitados	0,029	0,040	0,60
Biorreator	0,035	0,054	0,69

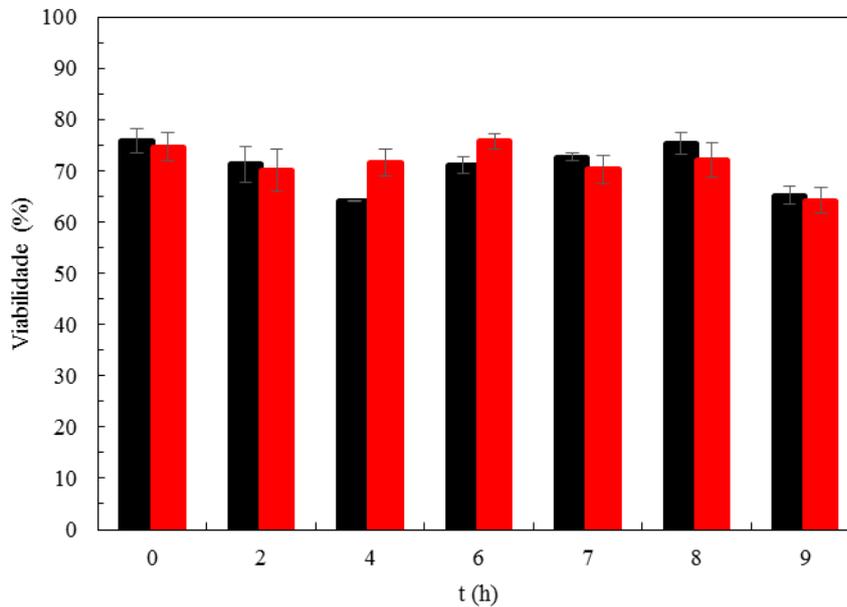
$Y_{G/S}$: coeficiente de rendimento glicerol-substrato; $P_{G/X}$: produtividade específica em glicerol; $P_{V,G}$: produtividade volumétrica em glicerol. Os parâmetros foram calculados com os dados da última hora de fermentação (9 h).

Observa-se que tanto o $Y_{G/S}$ quanto as produtividades foram maiores no ensaio em biorreator.

No ensaio em biorreator utilizou-se condensador com o intuito de minimizar a perda de etanol para o meio. Ao somar os coeficientes de rendimento dos ensaios realizados em frascos agitados e em biorreator obteve-se 82 e 92%, respectivamente. Com isso é possível aferir que pode ter corrido perda de etanol durante o processo fermentativo em frascos agitados.

A viabilidade celular foi avaliada durante os processos fermentativos em frascos agitados e em biorreator, os resultados podem ser verificados na Figura 24.

Figura 24 - Viabilidade da linhagem termotolerante durante processo fermentativo a 40 °C em frascos agitados (preto) e em biorreator (vermelho) com concentração celular inicial em torno de 10 g/L, utilizando o meio de fermentação MF1.

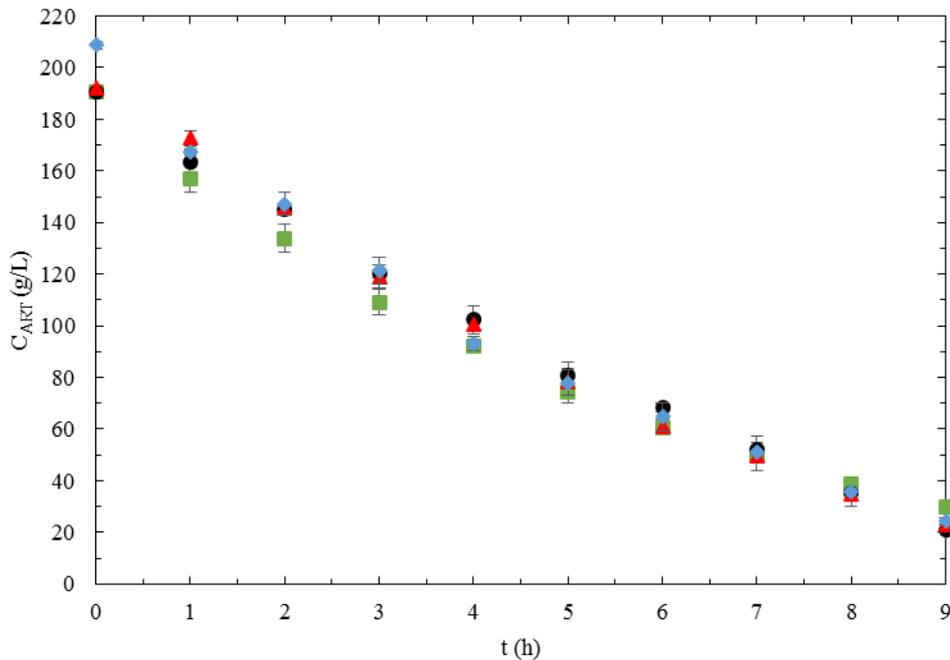


Observa-se que a linhagem termotolerante teve o mesmo comportamento em ambas fermentações, mantendo a viabilidade ao longo do processo.

4.3.2 Ensaio de fermentação em biorreator no modo batelada com arraste de etanol por CO₂

Após análise do ensaio realizado em biorreator no modo batelada convencional, realizaram-se experimentos de fermentação no modo batelada com arraste de etanol por CO₂ a 40 °C, utilizando o meio de fermentação MF1 e concentração celular inicial em torno de 10 g/L. Baseado nos resultados anteriores e no estudo realizado por Sonogo (2016) e Moraes (2016), optou-se por testar três vazões de gás (2,5, 1,5 e 1,0 vvm) e começar a injeção de CO₂ na terceira hora de fermentação. Na Figura 25 observa-se o consumo de substrato nestes experimentos e no ensaio em batelada convencional.

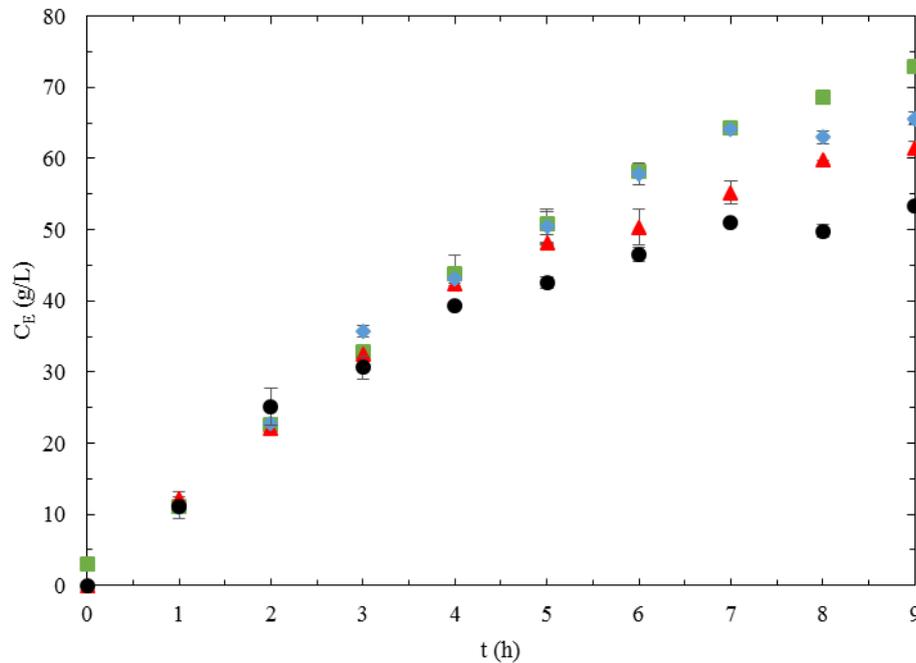
Figura 25 - Consumo de ART pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em ensaios de fermentação no modo batelada convencional (■) e batelada com arraste de etanol com vazão específica de gás de 2,5 (●), 1,5 (▲) e 1,0 vvm (◆) a partir da 3ª hora do início do experimento.



Observa-se na Figura 25 que o consumo de substrato ocorreu de forma semelhante em todos os casos. Contudo, a maior concentração de açúcares residuais foi na fermentação convencional (30 g/L ART), sendo que na fermentação extrativa com vazão específica de CO_2 de 2,5 vvm a concentração de açúcares residuais foi 30% menor, com 2,0 vvm, 24% e com 1,0 vvm, 19%.

No que diz respeito ao perfil de concentração de etanol no meio fermentativo durante os ensaios em batelada convencional e batelada com extração deste produto, observa-se na Figura 26 que a menor concentração de etanol no meio ocorreu com a aplicação da maior vazão específica de CO_2 . Na batelada convencional a concentração máxima de etanol foi 73 g/L, na fermentação extrativa com vazão específica de 2,5 vvm, 53 g/L, com 1,5 vvm, 62 g/L e com 1,0 vvm, 66 g/L.

Figura 26 - Formação de etanol pela linhagem termotolerante de *K. marxianus* em ensaios de fermentação no modo batelada convencional (■) e batelada com arraste de etanol com vazão específica de gás de 2,5 (●), 1,5 (▲) e 1,0 vvm (◆) a partir da 3ª hora do início do experimento.



Com base nos resultados das Figuras 25 e 26 é possível constatar que o arraste de etanol por CO_2 proporcionou maior consumo de açúcares e reduziu a concentração de etanol no meio. Associa-se este comportamento à redução da inibição do metabolismo celular causada pela presença de etanol.

Na Tabela 24 são apresentados os valores do coeficiente de rendimento células-substrato, velocidade específica máxima de crescimento celular, concentração de etanol no caldo, concentração total de etanol e produtividades volumétrica e específica em etanol dos ensaios em batelada convencional e com arraste de etanol.

Tabela 24 - Coeficientes de rendimento, velocidade específica máxima de crescimento celular, concentrações de etanol e produtividades em etanol dos processos fermentativos no modo batelada e batelada com arraste de etanol, empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus*.

	Fermentação convencional	Fermentação com arraste 2,5 vvm	Fermentação com arraste 1,5 vvm	Fermentação com arraste 1,0 vvm
Y_{X/S} (gx/gS)	0,022	0,029	0,034	0,028
μ_{max} (h⁻¹)	0,11	0,094	0,11	0,080
C_E (g/L)	73	53	62	66
C_{E, total} (g/L)	73	75 ¹	74 ¹	81 ¹
P_{E/X} (g_E/g_X·h)	0,64	0,58	0,55	0,63
P_V (g_E/L·h)	8,11	8,29	8,28	9,02

Y_{X/S}: coeficiente de rendimento células-substrato; μ_{max}: velocidade específica máxima de crescimento; C_E: concentração de etanol no caldo; C_{E, total}: concentração total de etanol; P_{E/X}: produtividade específica em etanol; P_V: produtividade volumétrica em etanol.

¹ Calculados considerando Y_{E/S} = 0,44 g_E/g_S.

Observa-se na Tabela 24 que o valor de Y_{X/S} foi maior nos ensaios realizados com arraste, O valor de μ_{max} foi o mesmo no ensaio em batelada e na fermentação extrativa com vazão de 1,5 vvm.

A menor concentração de etanol no caldo foi alcançada na fermentação extrativa com a maior vazão específica de gás (2,5 vvm). Quanto a concentração total de etanol, esta foi maior nos ensaios empregando arraste. Dentre estes experimentos o melhor resultado foi obtido com a menor vazão de gás (esse experimento iniciou-se com maior concentração de ART no meio reacional).

A produtividade específica foi maior na fermentação convencional (menor concentração celular) seguida da fermentação extrativa a 1,0 vvm. Por fim, a produtividade

volumétrica foi maior nos ensaios com arraste e dentre estes o melhor resultado foi obtido no ensaio com vazão de 1,0 vvm (9,02 g_E/L·h).

Com a análise dos resultados da Tabela 24 e das Figuras 25 e 26, verifica-se que os experimentos com arraste proporcionaram incrementos na produção de etanol pois foi possível reduzir a concentração de açúcares residuais. Dentre as fermentações com arraste, o ensaio com maior vazão específica de CO₂ proporcionou a menor concentração de etanol no caldo e a maior redução da concentração de açúcares residuais, contudo os melhores resultados em termos de C_{E, total}, P_{E/X} e P_V foram para a condição com a menor vazão específica de CO₂, consequência da maior concentração inicial de açúcares nesta condição.

Sonego (2016) realizou ensaios em batelada convencional e com arraste a 34 °C utilizando linhagem comercial de *S. cerevisiae*. Na fermentação com arraste a alimentação de CO₂ começou na 3^a hora e a vazão específica de gás utilizada foi 2 vvm. Nesta condição, o autor conseguiu arrastar 18% de etanol e obteve um aumento na produtividade volumétrica de 20% em relação à fermentação convencional. Neste trabalho quando utilizou-se a vazão específica de gás de 1,5 vvm, menor que a do trabalho de Sonego (2016), arrastou-se 16% de etanol, apenas 2% a menos com uma vazão 25% menor. Em termos de produtividade, não se obteve grande incremento em comparação com a fermentação convencional o que pode ter sido consequência da possível tolerância ao etanol da linhagem de *K. marxianus* (isolada do processo industrial). Kumar *et al.* (2015) utilizaram uma linhagem de *K. marxianus* em processo de arraste de etanol por N₂ e também não obtiveram incrementos em termos de rendimento e produtividade. Contudo, apontaram como vantagem do sistema a alta concentração de etanol no condensado, o que torna a recuperação do produto mais econômica do que no processo convencional.

Além da avaliação da produção de etanol nos ensaios com arraste de etanol, analisou-se também a produção de glicerol. Na Tabela 25 são apresentados os resultados desta análise nas fermentações com arraste em comparação com a fermentação convencional.

Tabela 255 - Coeficientes de rendimento e produtividades em glicerol dos processos fermentativos no modo batelada convencional e batelada com arraste de etanol, empregando linhagem termotolerante de *K. marxianus*.

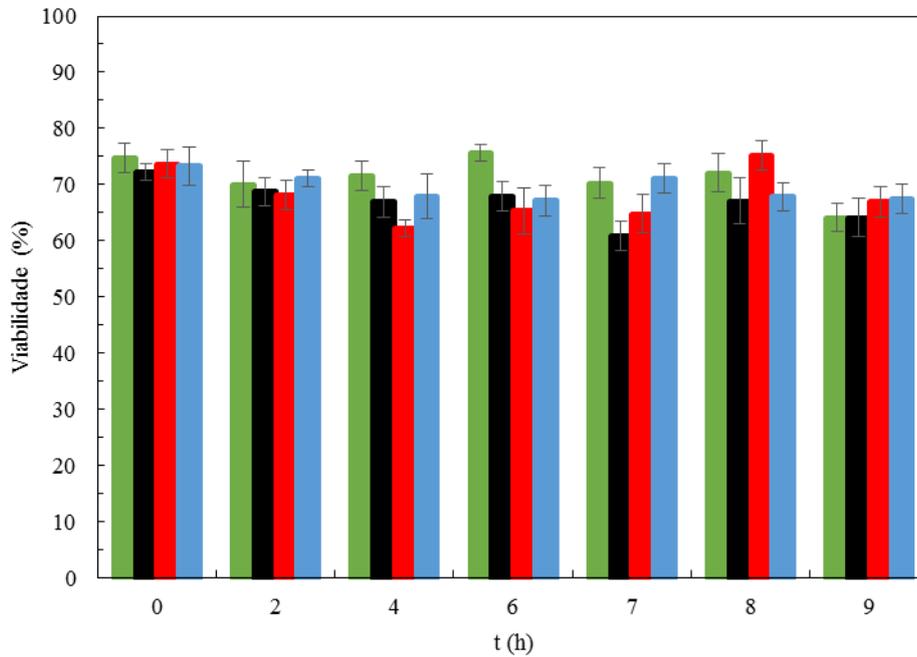
	Fermentação convencional	Fermentação com arraste 2,5 vvm	Fermentação com arraste 1,5 vvm	Fermentação com arraste 1,0 vvm
$Y_{G/S}$ (gG/gS)	0,035	0,046	0,045	0,038
$P_{G/X}$ (gG/gx.h)	0,054	0,065	0,056	0,055
$P_{V,G}$ (gG/L.h)	0,69	0,93	0,84	0,79

$Y_{G/S}$: coeficiente de rendimento glicerol-substrato; $P_{G/X}$: produtividade específica em glicerol;
 $P_{V,G}$: produtividade volumétrica em glicerol.

Dentre os ensaios com arraste, observa-se que tanto o $Y_{G/S}$ quanto as produtividades diminuíram com o decréscimo da vazão específica de CO_2 . Comparando a fermentação convencional com as com arraste, os menores valores foram obtidos na fermentação convencional e os maiores na fermentação com arraste utilizando vazão de gás de 2,5 vvm.

A viabilidade celular foi avaliada durante os processo fermentativos no modo batelada convencional e batelada com arraste de etanol em diferentes vazões de gás, o resultado pode ser analisado na Figura 27.

Figura 27 - Viabilidade da linhagem termotolerante de *K. marxianus* durante processo fermentativo no modo batelada convencional (verde) e com arraste de etanol com vazão específica de gás de 2,5 (preto), 1,5 (vermelho) e 1 vvm (azul).



Verifica-se na Figura 27 que a linhagem de *K. marxianus* manteve a viabilidade durante os processos fermentativos e que a injeção de CO₂ não afetou a mesma.

4.4 Simulação e ajuste dos parâmetros do modelo cinético

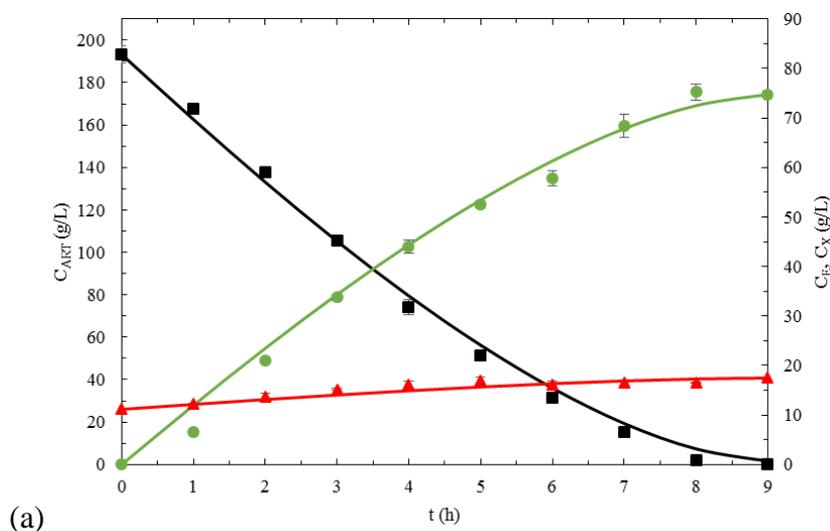
Após análise dos processos fermentativos foi proposto para os ensaios de fermentação com a linhagem de *K. marxianus* em frascos agitados (ensaios de avaliação da temperatura ótima de fermentação) e em biorreator o modelo cinético de Levenspiel para representar o crescimento celular. Os parâmetros cinéticos do modelo (K_s e $C_{Emáx}$) foram ajustados a partir dos dados experimentais empregando pacote de otimização baseado em algoritmo genético flexível (optim_ga) do *Scilab* (versão 5.5.1) e as equações diferenciais resultantes dos balanços materiais foram resolvidas pelo algoritmo Runge-Kutta.

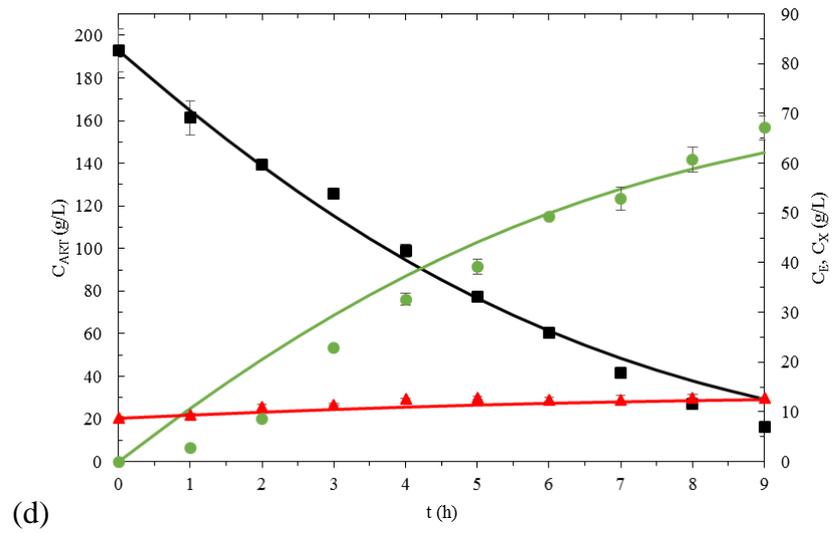
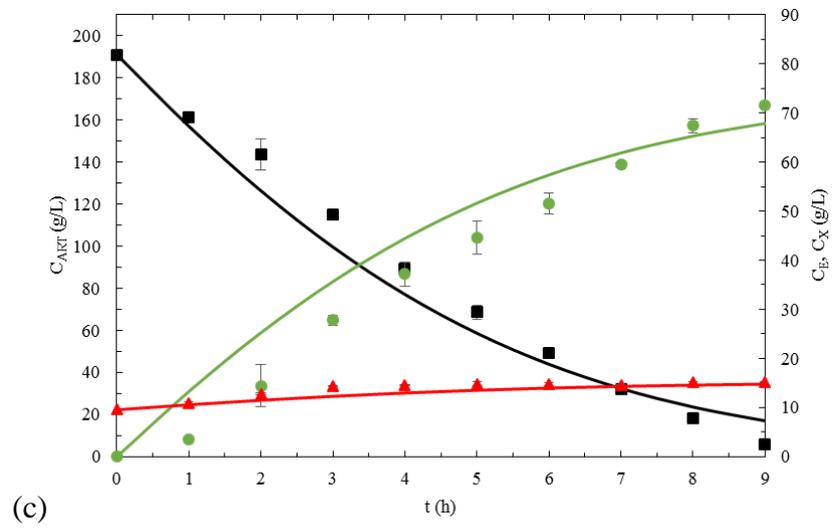
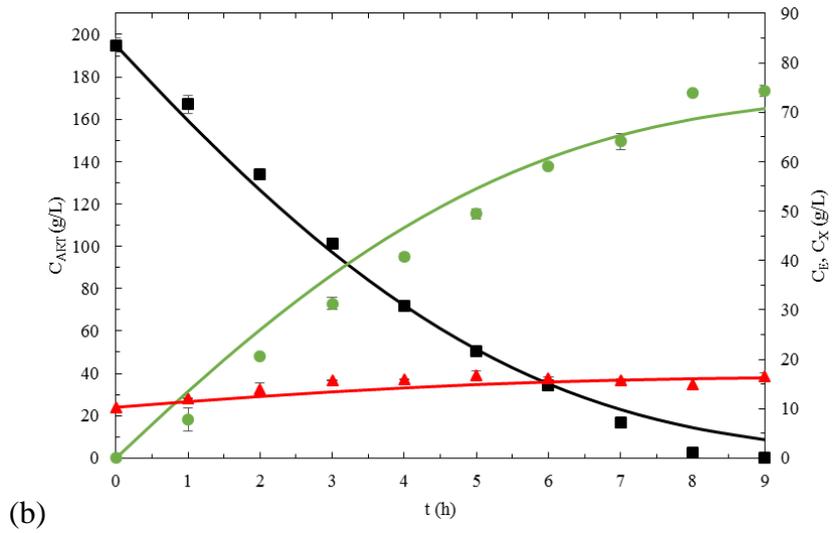
4.4.1 Simulação e ajuste dos parâmetros do modelo das fermentações realizadas em frascos agitados que avaliaram a temperatura ótima de fermentação da linhagem de *K. marxianus*

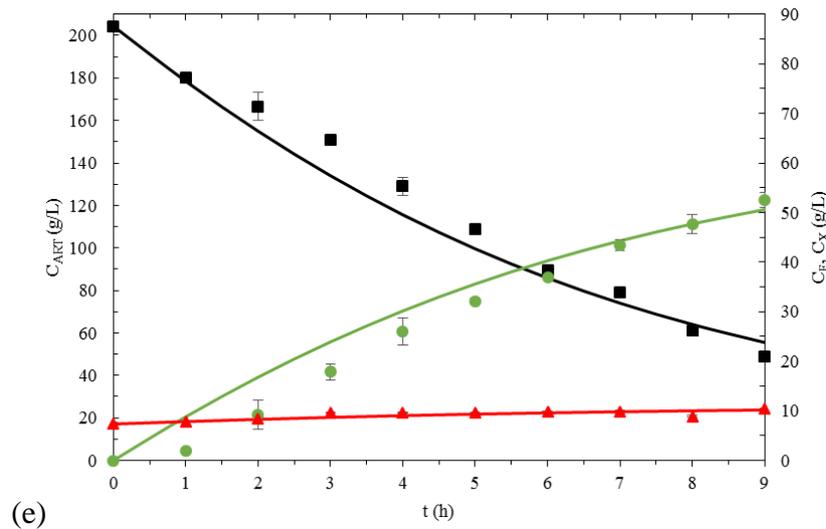
Os parâmetros do modelo cinético de Levenspiel (K_S e $C_{E_{máx}}$) foram obtidos com base no melhor ajuste entre os dados experimentais e simulados de C_S , C_E e C_X . Para tal, foi utilizado pacote de otimização do *Scilab* e as equações de balanço de massa do processo fermentativo, bem como os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente ($Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$ e $\mu_{máx}$).

Na Figura 28 é possível avaliar o ajuste dos dados simulados aos dados experimentais das fermentações em frascos agitados com a linhagem termotolerante em diferentes temperaturas.

Figura 28 - Valores de C_S (preto), C_E (verde) e C_X (vermelho) experimentais e simulados das fermentações em frascos agitados utilizando a linhagem de *K. marxianus* nas temperaturas de (a) 36, (b) 38, (c) 40, (d) 42 e (e) 44 °C. Linhas são os valores simulados e símbolos os valores experimentais.







Observa-se na Figura 28 que os dados simulados se ajustaram aos dados experimentais, demonstrando que o modelo cinético de Levenspiel representou de forma adequada o perfil de C_S , C_E e C_X ao longo dos ensaios de fermentação.

Na Tabela 26 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel dos ensaios em frascos agitados em diferentes temperaturas, sendo que o $\mu_{m\acute{a}x}$ foi obtido por meio da Equação 9 e o K_s e $C_{Em\acute{a}x}$ foram ajustados a partir dos dados experimentais, empregando a rotina de otimização do *Scilab*.

Tabela 26 - Parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel dos ensaios em frascos agitados.

	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	44 °C
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,096	0,14	0,14	0,097	0,087
K_s (g/L)	8,9	46,0	49,6	49,7	49,9
$C_{Em\acute{a}x}$ (g/L)	119,6	117,8	100,0	103,0	74,3

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade específica máscima de crescimento celular; K_s : constante de saturação e $C_{Em\acute{a}x}$: concentração máscima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular.

Analisando os resultados obtidos para o $\mu_{m\acute{a}x}$ observa-se valores semelhantes nas temperaturas de 38 e 40 °C, 36 e 42 °C, sendo que o menor valor foi obtido a 44 °C.

Em termos de K_s , verifica-se que este aumentou com o aumento da temperatura. Nota-se ainda que a 36 °C o valor obtido foi muito inferior aos obtidos na faixa de 38-44 °C.

O $C_{Em\acute{a}x}$ também aumentou com o aumento da temperatura, com destaque ao valor obtido a 44 °C, que foi muito inferior aos demais.

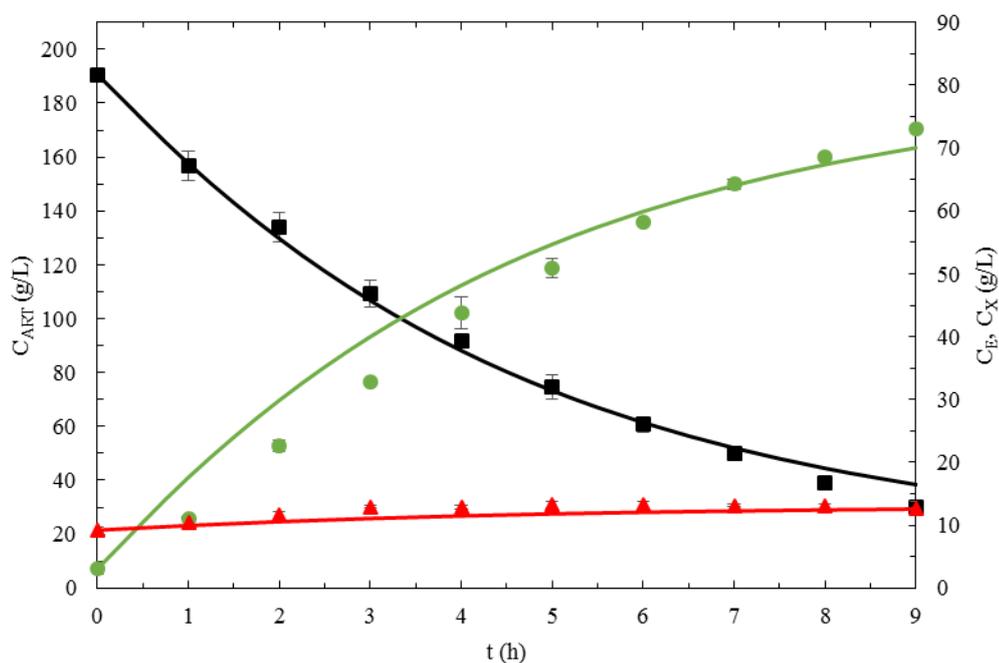
O comportamento dos valores de $\mu_{\text{máx}}$, K_s e $C_{\text{Emáx}}$ estão de acordo com o que já foi analisado anteriormente. Com o aumento da temperatura houve aumento da concentração de açúcares residuais no meio de fermentação e tanto a produção de etanol quanto o crescimento celular diminuiram, mostrando a influência negativa de temperaturas altas no metabolismo celular.

4.4.2 Simulação e ajuste dos parâmetros do modelo da fermentação realizada em biorreator no modo batelada convencional

Novamente, os parâmetros do modelo cinético de Levenspiel (K_s e $C_{\text{Emáx}}$) foram obtidos com base no melhor ajuste entre os dados experimentais e simulados de C_S , C_E e C_X . Para tal, foi utilizado a rotina de otimização do *Scilab* e as equações de balanço de massa do processo fermentativo, bem como os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente ($Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$ e $\mu_{\text{máx}}$).

Na Figura 29 é possível avaliar o ajuste dos dados simulados aos dados experimentais da fermentação com a linhagem termotolerante em biorreator a 40 °C.

Figura 29 - Valores de C_S (preto), C_E (verde) e C_X (vermelho) experimentais e simulados da fermentação em biorreator a 40 °C utilizando a linhagem de *K. marxianus*. Linhas são os valores simulados e símbolos os valores experimentais.



Verifica-se na Figura 29 que os dados simulados se ajustaram aos dados experimentais, demonstrando que o modelo cinético de Levenspiel representou de forma adequada o perfil de C_S , C_E e C_X ao longo do ensaio de fermentação.

Na Tabela 27 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel do ensaio em biorreator e em frascos agitados realizados nas mesmas condições, sendo que o $\mu_{\text{máx}}$ foi obtido através da Equação 9 e o K_S e $C_{E\text{máx}}$ foram ajustados a partir dos dados experimentais, empregando a rotina de otimização do *Scilab*.

Tabela 27 - Parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel do ensaio realizado em frascos agitados e em biorreator.

	Frascos agitados	Biorreator
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,14	0,11
K_S (g/L)	49,6	47,71
$C_{E\text{máx}}$ (g/L)	100,0	86,91

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica máxima de crescimento celular;
 K_S : constante de saturação e $C_{E\text{máx}}$: concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular.

Comparando os resultados obtidos em frascos agitados e em biorreator, observa-se que todos os parâmetros foram maiores no ensaio realizado em frascos agitados. O que está de acordo com o que foi obtido experimentalmente, uma vez que em biorreator o crescimento celular foi menor e a concentração de açúcares residuais e a produção de etanol foram maiores do que no ensaio em frascos agitados. Destaca-se ainda que a produção de etanol no ensaio realizado em biorreator foi maior até a sétima hora de processo, sendo que a partir deste momento a produção se igualou à obtida no ensaio realizado em frascos agitados, possivelmente devido à inibição por etanol.

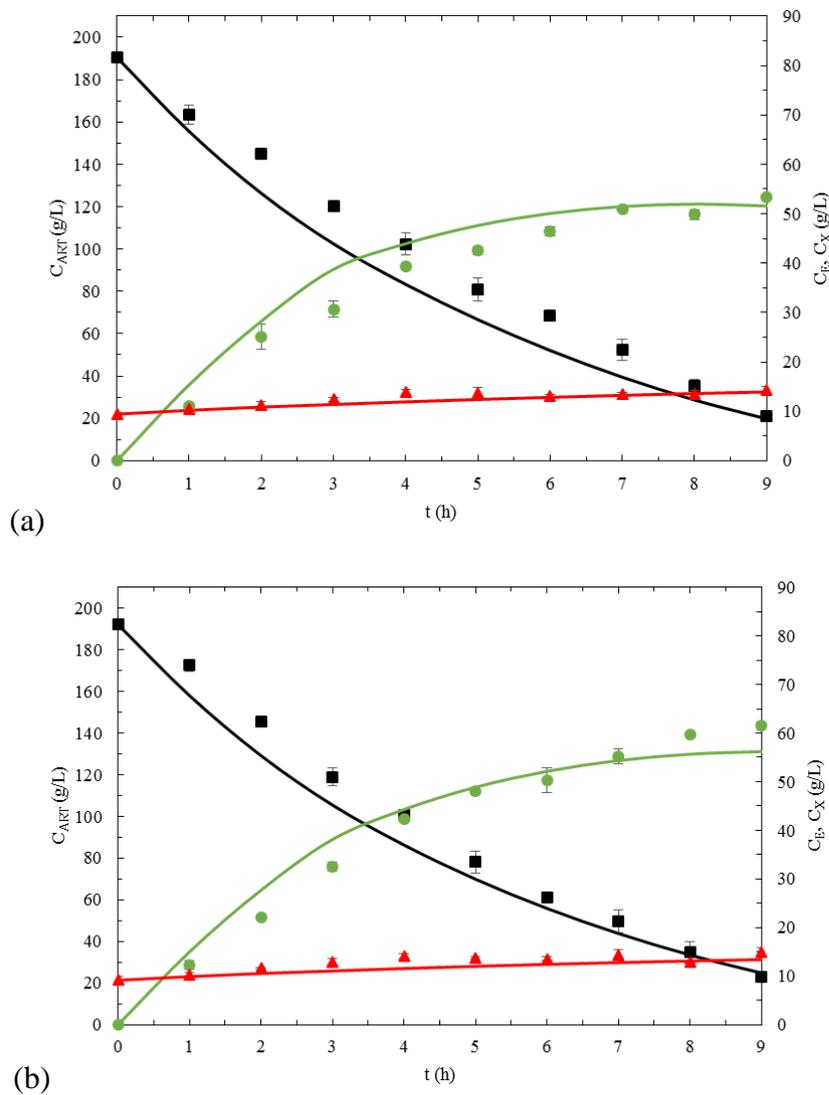
4.4.3 Simulação dos ensaio de fermentação realizados em biorreator no modo batelada com arraste de etanol por CO_2

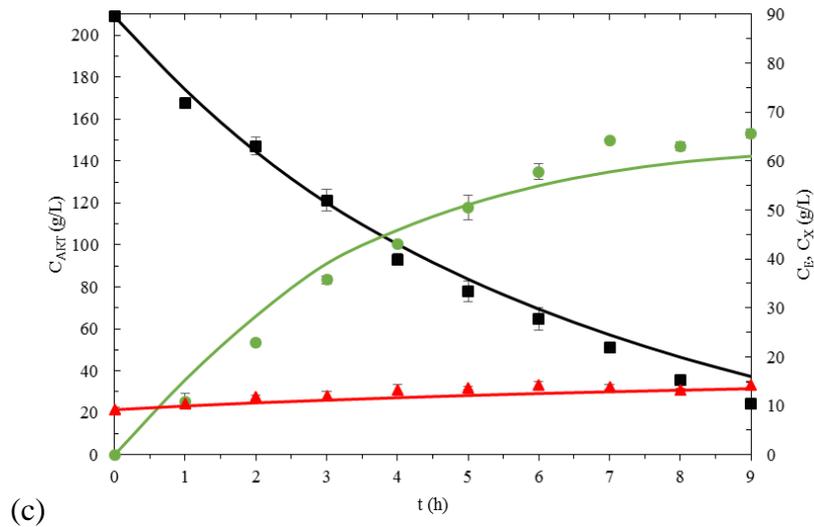
Na simulação das fermentações em biorreator com arraste de etanol utilizou-se em conjunto as equações de balanço de massa do processo, o modelo cinético de Levenspiel, os parâmetros cinéticos ($\mu_{\text{máx}}$, $Y_{X/S}$, $Y_{E/S}$, K_S e $C_{E\text{máx}}$) obtidos na fermentação convencional, as

constantes de velocidade de remoção de etanol e água obtidas a partir do estudo realizado por Moraes (2016) (rever Tabela 15) e a massa específica da água a 40 °C.

Na Figura 30 é possível avaliar o ajuste dos dados simulados ao dados experimentais nas fermentações com arraste de etanol por CO₂ (2,5, 1,5 e 1,0 vvm).

Figura 30 - Valores de C_S (preto), C_E (verde) e C_X (vermelho) experimentais e simulados das fermentações com arraste de etanol nas vazões específicas de CO₂ de (a) 2,5, (b)1,5 e (b) 1 vvm. Linhas são os valores simulados e símbolos os valores experimentais.





Analisando a Figura 30, observa-se que os dados simulados se ajustaram aos dados experimentais, demonstrando que o modelo cinético de Levenspiel representou de forma adequada o perfil de C_S , C_E e C_X ao longo dos ensaios de fermentação.

Com as simulações dos processos fermentativos e com a determinação dos parâmetros cinéticos do modelo de Levenspiel foi possível confirmar análises realizadas nos tópicos anteriores e fornecer informações que poderão ser utilizadas em trabalhos futuros.

5 Conclusões

Propagação da linhagem termotolerante de *K. marxianus*

Foi desenvolvido protocolo para propagação da levedura termotolerante *K. marxianus* empregando cultivo em batelada alimentada. A levedura foi preservada em criotubos (-70 °C) e dessa forma foi possível iniciar os ensaios de fermentação com concentração celular em torno de 10 g/L.

Ensaio de fermentação em frascos agitados

Análise 1: Comparação do desempenho da linhagem termotolerante com o de leveduras convencionais

Ao ser comparada com as linhagens comercial e industrial de *S. cerevisiae* nas suas temperaturas ótimas de trabalho (34 °C), a linhagem de *K. marxianus* (40 °C) apresentou desempenho inferior ao das leveduras convencionais. Contudo, o valor da concentração de etanol alcançada pela linhagem termotolerante (72 g/L) está dentro do que se alcança nas usinas brasileiras (69-108 g/L). Destaca-se ainda que nos experimentos realizados a 40 °C com as leveduras convencionais, estas apresentaram uma queda em seu desempenho, colocando em evidência a vantagem de se utilizar linhagens termotolerantes em locais de clima quente onde se tem dificuldade de controlar a temperatura do processo em torno de 34 °C.

Análise 2: Ensaio com a linhagem termotolerante em meio composto por sorgo sacarino, sorgo sacarino suplementado com nutrientes e sorgo sacarino suplementado em mistura com melão

Observou-se nos processos fermentativos empregando caldo de sorgo sacarino que a linhagem termotolerante *K. marxianus* obteve bom desempenho. A linhagem termotolerante manteve a viabilidade celular em torno de 75% e consumiu totalmente os açúcares presentes nos meios de fermentação. Entretanto, a concentração final de etanol foi baixa; tal fato foi atribuído à baixa concentração de açúcares redutores presentes no caldo de sorgo, o que pode ser melhorado pela adição de melão ou pela concentração do caldo.

*Análise 3: Avaliação da temperatura ótima de fermentação da linhagem de *K. marxianus**

Nos ensaios de fermentação com a levedura termotolerante *K. marxianus* a produtividade volumétrica diminuiu com o aumento da temperatura. O valor do coeficiente

estequiométrico $Y_{E/S}$ foi semelhante na faixa de 36 a 42 °C. Tais fatos foram atribuídos à influência negativa de altas temperaturas no metabolismo celular e/ou à perda de etanol devido a evaporação durante os ensaios. Assim, escolheu-se a temperatura de 40 °C como sendo a ideal, pois esta é uma temperatura que pode proporcionar uma redução nas chances de contaminação do processo fermentativo por microrganismos mesófilos. Em locais de clima quente torna-se mais fácil o controle da temperatura do meio de cultivo neste valor (40 °C).

Ensaio de fermentação em biorreator

Fermentação no modo batelada convencional

Ao realizar o ensaio de fermentação em biorreator operado no modo batelada e comparar os resultados com o ensaio realizado em frascos agitados, nas mesmas condições, foi possível verificar que a produção de etanol foi beneficiada no processo realizado em biorreator, pois este reduziu as perdas de etanol por evaporação e arraste devido ao uso de condensador no sistema experimental. Contudo, a concentração de açúcares residuais foi alta, o que pode ser atribuído à inibição causada pelo aumento da concentração de etanol no meio de fermentação.

Fermentações no modo batelada com arraste de etanol

Os ensaios de fermentação em biorreator nos quais se empregou o arraste de etanol por CO₂ proporcionaram incrementos na produção de etanol. No experimento no qual a vazão específica de gás foi de 2,5 vvm houve uma redução de 30% dos açúcares residuais e o arraste de 29% do etanol do meio de cultivo. Neste ensaio a produtividade volumétrica obtida foi pouco superior ao valor observado no ensaio em batelada sem arraste.

Modelagem e simulação

O modelo matemático proposto para representar os processos fermentativos com a linhagem de *K. marxianus* foi capaz de fornecer uma descrição adequada dos comportamentos das fermentações analisadas.

6 Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se para trabalhos futuros:

- estudar as faixas de concentração de açúcares e de etanol que podem levar à inibição do metabolismo celular da linhagem de *K. marxianus*;
- realizar ensaios de fermentação com caldo de sorgo sacarino concentrado (ART \approx 180 g/L);
- realizar ensaios de arraste de etanol empregando maiores concentrações de açúcar no início da fermentação;
- analisar o melhor momento para iniciar o processo de arraste nos ensaios de fermentação extrativa;
- recuperar e quantificar o etanol arrastado.

7 Referências bibliográficas

ABDEL-FATTAH, W. R. *et al.* Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 531-535, Jun 1999.

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845–864, Nov 1968.

ALMEIDA, J.; FAVARO, L. D. L. Leveduras para produção de etanol de sorgo sacarino. In: EMBRAPA AGROENERGIA. **Agroenergia em Revista**. Brasília: Embrapa Agroenergia, p. 29-30, 2011.

AMORIM, H. V. *et al.* Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, Set 2011.

ANDRIETTA, M. D. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. **Revista Multiciência: Construindo a História dos produtos naturais**, p. 1-16, 2006.

ANDRZEJEWSKI, B. *et al.* Development of a sweet sorghum juice clarification method in the manufacture of industrial feedstocks for value-added fermentation products. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 77-87, Jan 2013.

ARIYAJAROENWONG, P. *et al.* Repeated-Batch Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Sweet Sorghum Stalks. **Energies**, v. 5, n. 4, p. 1215-1228, Abr 2012.

ARORA, R. *et al.* A new search for thermotolerant yeasts, its characterization and optimization using response surface methodology for ethanol production. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 16, Set 2015.

ATALA, D. I. P. **Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo Fermentativo Extrativo de Produção de Etanol**. 2004. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BABIKER MA *et al.* High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-867, 2010.

BADINO, A. C.; CRUZ A. J. G. **Reatores Químicos e Bioquímicos um texto introdutório**. 1 ed. São Carlos: UAB-UFSCar, 2012. 191 p.

BANAT, I. M. *et al.* Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 809-821, Nov 1998.

BARBOSA, V. F. A. M. Planting. In: SANTOS F.; BORÉM A.; CALDAS C. **Sugarcane**.

Agricultural production, Bioenergy and ethanol. Londres: Elsevier, 2015. p.35-52.

BARCELOS, C. A. *et al.* Ethanol production from sorghum grains [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]: evaluation of the enzymatic hydrolysis and the hydrolysate fermentability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 597-604, 2011.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioetanol.** 2012. 334 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BARISANO, D. *et al.* **State of the art on bioethanol production.** Roma: Ente per le Nuove Tecnologia, l'Energia e l'Ambiente, Dipartimento Energia, 2001. 97 p.

BARRETO, T. V.; COELHO A. C. D. Distillation. In: SANTOS F.; BORÉM A.; CALDAS C. **Sugarcane. Agricultural production, Bioenergy and ethanol.** Londres: Elsevier, 2015. p.341-364.

BASSO, L. C., OLIVEIRA, A. J., ORELLI, V. F. D. M., CAMPOS, A. A., GALLO, C. R., AMORIM, A.H. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5, 1993 Piracicaba. p. 45-49.

BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production - Recent Developments and Prospects**, v. 1530, p. 85–100, 2011.

BELEM, M. A. F. e LEE, B. H. Production of Bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Whey: An Alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38 , n. 7, p. 565-598, 1998.

BELLOCH, C. *et al.* Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Yeast**, v. 14, n. 15, p. 1341-1354, Nov 1998.

BIOMATRIX. **Sorgo forrageiro.** Disponível em: <http://biomatrix.com.br/pt/sorgo.php>. Data de acesso em: 09/2016

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura.** Brasília, 2012. 176 p.

BRASIL. FIESP. **Outlook Fiesp 2023 Projeções para o Agronegócio Brasileiro.** São Paulo, 2013. 112 p.

BROUWER, C.; HEIBLOEM, M. Irrigation water management: irrigation water needs. Training manual, v. 3, 1986.

BUSINESS STANDARD. Disponível em: http://www.business-standard.com/article/economy-policy/india-starts-producing-ethanol-from-sweet-sorghum-107061501004_1.html. Data de acesso em: 04/2016.

CAMARGO, C. D. *et al.* **Conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool**. Ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1990. 796 p.

CAO, W. X. *et al.* Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 215-221, Maio 2012.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, Set 2007.

CARDONA, C. A.; SÁCHEZ, Ó. J.; GUTIÉRREZ, L. F. **Process synthesis for ethanol production**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 389 p.

COELHO, A. M. *et al.* Seja o doutor do seu sorgo. **Informações Agronômicas**, Arquivo do agrônomo n. 14, p. 1-24, Dez 2002.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Safra 2015/16. Relatório. 2016.

DALE, B. Biofuels: Thinking clearly about the issues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3885-3891, Jun 2008.

DASGUPTA, D. *et al.* Ethanol fermentation from molasses at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp IPE453 and energy assessment for recovery. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 10, p. 2019-2029, Out 2014.

DEESUTH, O. *et al.* Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 95-102, Nov 2015.

DURÃES, F. O. Sorgo sacarino: desenvolvimento de tecnologia agronômica. In: EMBRAPA AGROENERGIA. **Agroenergia em Revista**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 7.

EIADPUM, A.; LIMTONG, S.; PHISALAPHONG, M. High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 3, p. 325-329, Set 2012.

ELIA, A.; SHINTAKU, A. Usos e reúsos de água e geração de efluentes. In: AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUA; FIESP; UNICA; CTC. **Manual de conservação e reúso de água na agroindústria sucroenergética**. Brasília: ANA, 2009. p. 69-179.

EMBRAPA. **Sorgo sacaríneo**. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3847343/10-congresso-internacional-de-bioenergia-premia-trabalho-sobre-sorgo-sacarino>. Data de acesso em: 09/2016.

EMBRAPA. **Sorgo granífero**. 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br>

/publicacoes /publica/2008/folders/Fol_10.pdf. Data de acesso em: 09/2016.

EMYGDIO, B. *et al.* **Desempenho de cultivares de sorgo sacarino para a produção de etanol sob diferentes densidades de plantas.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2011. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 156, 2011. 22 p.

ETHANOL PRODUCER MAGAZINE. Disponível em: [_http://www.ethanolproducer.com/plants/listplants /US/All/All](http://www.ethanolproducer.com/plants/listplants /US/All/All). Data de acesso em: 04/2016.

EUA. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. **Grain: World Markets and Trade.** 2015. 56 p.

EUA. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Disponível em: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_BeijingChina%20-%20Peoples%20Republic%20of_11-4-2014.pdf. Data de acesso em: 04/2016.

FALCO, F. C. Fed-Batch Production of Endoglucanase with Recombinant Industrial Strain of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. **Chemical engineering transactions**, v. 38, n. 38, p 379-384, 2014.

FERMENTEC. **Linhagens de leveduras personalizadas® para produção de etanol: seleção dirigida pelo processo.** 1 ed. Piracicaba: Fermentec Tecnologias em Açúcar e Álcool Ltda., 2015. 42 p.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. L. AND TORRESTIANA-SÁNCHEZ, B., SALGADO-CERVANTES, M. A., GARCÍA, P.G.MENDOZA, AGUILAR-USCANGA, M. G. Use of sugarcane molasses “B” as an alternative for ethanol production with wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 605-614, 2012.

FERNANDES, G. *et al.* Evaluation of potential ethanol production and nutrients for four varieties of sweet sorghum during maturation. **Renewable Energy**, v. 71, p. 518-524, Nov 2014.

FERREIRA A. Arranjo de Plantas para o cultivo de Sorgo Sacarino. In: **Documentos técnicos 145. Seminário Temático Agroindustrial de Produção de Sorgo Sacarino para Bioetanol**, 2012. p. 42-47.

FONSECA, G. G. *et al.* Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **Fems Yeast Research**, v. 7, n. 3, p. 422-435, Maio 2007.

GAO, F.; DAUGULIS, A. J. Bioproduction of the Aroma Compound 2-Phenylethanol in a Solid-Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor System by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 332-339, Out 2009.

GOMES, S. C. M. P. **Produção de etanol utilizando mix de sorgo sacarino e cana-de-açúcar em processo de maturação.** 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

GOUGH, S. *et al.* Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3: Simplex optimisation of media supplements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 187-190, Set 1996.

GROOT, W. J.; VANDERLANS, R.; LUYBEN, K. Batch and continuous butanol fermentations with free-cells - integration with product recovery by gas-stripping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 305-308, Dez 1989.

GUIGOU, M. *et al.* Bioethanol production from sweet sorghum: Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3058-3062, Jul 2011.

GUO, M. X.; SONG, W. P.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712-725, Fev 2015.

HACK, C. J.; MARCHANT, R. Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 323-327, Jun 1998.

HACKING, A. J.; TAYLOR, I. W. F.; HANAS, C. M. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40 °C. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 361-363, Dez 1984.

HENSING, M. *et al.* Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 516-521, Dez 1994.

HUGHES, S. R. *et al.* Automated UV-C Mutagenesis of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 and Selection for Microaerophilic Growth and Ethanol Production at Elevated Temperature on Biomass Sugars. **Jala**, v. 18, n. 4, p. 276-290, Ago 2012.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. <https://www.iea.org/topics/renewables/subtopics/bioenergy/>. Data de acesso: 10/2015.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World Balance 2013. <http://www.iea.org/statistics/statisticssearch/report/?country=WORLD&product=Balances&year=2013> . Data de acesso: 10/2015.

JUNQUEIRA, T. L. **Análise de viabilidade técnico-econômica de alternativas de processo para a produção de etanol no Brasil**. 2015. 116 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

KIM, M. *et al.* Utilization of whole sweet sorghum containing juice, leaves, and bagasse for bio-ethanol production. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 1075-1080, Ago 2012.

KUMAR, S. *et al.* Cooling system economy in ethanol production using thermotolerant yeast *Kluyveromyces sp.* IPE453. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p. 39-44, Abr 2013.^a

KUMAR, S. *et al.* Kinetic studies of ethanol fermentation using *Kluyveromyces sp* IPE453.

Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 88, n. 10, p. 1874-1884, Out 2013.^b

KUMAR, S. *et al.* Continuous ethanol production from sugar cane bagasse hydrolysate at high temperature with cell recycle and in-situ recovery of ethanol. **Chemical Engineering Science**, v. 138, p. 524-530, Set 2015.

LANE, M. M. *et al.* Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 507-519, Nov 2011.

LEITE, R. C.; CORTEZ L. A. B. O etanol combustível no Brasil. In: MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES. **Biocombustíveis no Brasil - Realidades e Perspectivas**. Brasília: Ministério das Relações Exteriores, 2007. p. 161-175.

LEITE, R. *et al.* **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Brasília: Centro de Gestão de Estudos Estratégicos–CGEE, 2009. 538 p.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641–649, 1981.

LEVENSPIEL, O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1671–1687, ago. 1980.

LEWIS, W. K.; WHITMAN, W. G. Principles of gas absorption. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.16, n.12, p. 825-833, Dez 1924.

LI, S. Z. *et al.* A demonstration study of ethanol production from sweet sorghum stems with advanced solid state fermentation technology. **Applied Energy**, v. 102, p. 260-265, Fev 2013.

LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3367-3374, Dez 2007.

LIU, H. S.; HSU, H. W. Analysis of gas stripping during ethanol fermentation .1. In a continuous stirred tank reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 45, n. 5, p. 1289-1299, Ago 1990.

LU, J.; SHEAHAN, C.; FU, P. C. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 7, p. 2451-2466, Jul 2011.^a

LU, C. **Butanol Production from Lignocellulosic Feedstocks by Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation with Integrated Product Recovery**. 2011. 324 f. Tese (Doutorado) - Curso de Graduate Program In Chemical And Biomolecular Engineering, The Ohio State University, Ohio, 2011.^b

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 280-285, Jul 1985.

MACHADO, C. M. M.; AGROENERGIA, E. Produção de etanol de sorgo sacarino. In: EMBRAPA AGROENERGIA. **Agroenergia em Revista**. Brasília: Embrapa Agroenergia,

2011. p. 27-28.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; RODRIGUES, J. A. S. Ecofisiologia. In: COELHO *et al.* **Cultivo do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.

MARTINS, D. B. G. *et al.* The beta-galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. **Current Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 379-382, Maio 2002.

MASSON, I. *et al.* Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciencia rural**, v. 45, n. 9, p. 1695-1700, Set 2015.

MEEHAN, C. *et al.* Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Environment International**, v. 26, n. 1-2, p. 75-79, Ago 2000.

MF RURAL. **Sorgo vassoura**. Disponível em: <https://www.mfrural.com.br/mobile/ClassificadosAnuncio.aspx?id=155808#fotos>. Data de acesso em: 09/2016.

MORAES, J. M. **Plano de trabalho de Pesquisa**. Programa de Recursos Humanos (PRH), Agência Nacional do Petróleo (ANP), 2016.

MUTTON, M. J. R. Tecnologia industrial do sorgo sacarino, experiências de pesquisa e diretrizes tecnológicas. In: **Documentos técnicos 145. Seminário Temático Agroindustrial de Produção de Sorgo Sacarino para Bioetanol**, 2012. p. 28-33.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5 ed. Nova Iorque: W H. Freeman and Company, 2008. 1294 p.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52-68, Fev 2011.

NONKLANG, S. *et al.* High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7514-7521, Dez 2008.

NOVA CANA. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/usina-etanol-milho-sorgo-fiagril-la-ncada-lucas-rio-verde-mt-080316/>. Data de acesso em: 04/2016.^a

NOVA CANA. Disponível em: <https://www.novacana.com/cana/mecanizacao-producao-cana-de-acucar/>. Data de acesso em: 06/2016.^b

NUANPENG, S. *et al.* Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice at High Temperatures Using a Newly Isolated Thermotolerant Yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53. **Energies**, v. 9, n. 4, p. 20, Abr 2016.

OLIVEIRA, M. Opção produtiva: Sorgo é plantado para produzir etanol na entressafra de cana. **Revista Pesquisa FAPESP-Edição**, n. 193, p. 62-65, Mar 2012.

ONCEL, S. S. Microalgae for a macroenergy world. **Renewable & Sustainable Energy**

Reviews, v. 26, p. 241-264, Out 2013.

ONTARIO RESEARCH FOUNDATION. MULHOLLAND, D. L.; SHEPPARD, J. D. **Separation of volatiles from aqueous solutions by gas stripping**. U.S. Patent n. 4,703,007, 27 Out. 1987.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: Primeira ou segunda geração? **Circular Técnica 04**. Brasília: Embrapa Agroenergia, Abr 2011.

PACHECO, T. F. Tecnologia Industrial. In: **Documentos técnicos 139. Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa**, 2012. p. 92-106.^a

PACHECO, T. F. Índices Tecnológicos Industriais para Produção de Etanol de Sorgo Sacarino. In: **Documentos técnicos 145. Seminário Temático Agroindustrial de Produção de Sorgo Sacarino para Bioetanol**, 2012. p 24-28.^b

PACHECO, T. *et al.* Avaliação da fermentação de caldo de sorgo sacarino empregando leveduras comerciais. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química. n. 20, 2014, Florianópolis. Disponível em: <http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/avaliacao-da-fermentao-de-caldo-de-sorgo-sacarino-empregando-leveduras-comerciais-16707>. Data de acesso em: 08/2015.

PANG, Z. W. *et al.* Multiple induced mutagenesis for improvement of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 12, p. 1847-1851, Dez 2010.

PARK, C.-H.; GENG, Q. Simultaneous fermentation and separation in the ethanol and ABE fermentation. **Separation and Purification Methods**, v. 21, n. 2, p. 127-174, 1992.

PINTO, C. R. S. **Remoção de etanol por stripping empregando dióxido de carbono**. 2014. 175 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

PISKUR, J. *et al.* How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 183-186, Abr 2006.

PONCE, G. H. S. F. **Desenvolvimento de um processo fermentativo extrativo para produção de etanol por arraste gasoso**. 2015. 189 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

PORTAL JORNAL CANA. Disponível em: <https://www.jornalcana.com.br/eua-e-china-vaoinvestir-us-625-milhoes-em-projeto-de-sorgo-sacarino-na-africa-do-sul/>. Data de acesso em: 04/2016

PRONK, J. T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

PURCINO, A. Sorgo sacarino na Embrapa: histórico, importância e usos. In: EMBRAPA AGROENERGIA. **Agroenergia em Revista**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 6.

QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. **Renewable Energy**, v. 22, n. 4, p. 557-564, Abr 2001.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RADECKA, D. *et al.* Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **Fems Yeast Research**, v. 15, n. 6, p. 13, Set 2015.

RATNAVATHI, C. V. *et al.* Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice. **Biomass & Bioenergy**, v. 34, n. 7, p. 947-952, Jul 2010.

RFA - Renewable Fuels Association. **Going Global 2015 - Ethanol Industry Outlook**, 2014. 36 p.

RFA - Renewable Fuels Association. World Fuel Ethanol Production. Disponível em: http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#14540_98996479-8715d404-e546. Data de acesso em: 03/2017.

RIBAS, P. M. Importância econômica. In: COELHO *et al.* **Cultivo do sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.

RISSO, F. V. A. *et al.* Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 4, p. 507-516, Dez 2010.

ROUKAS, T. Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 296-301, 1994.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, Set 2008.

SCHAFFERT, R.; PARRELLA, R. D. C. Cultivares. In: **Documentos técnicos 139. Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa**, 2012. p. 14-22.

SCHMIDT, A.A.P. **O sorgo**. São Paulo: Icone, 1987. 63 p.

SCHULTZ, N. *et al.* Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 515-520, Jan 2006.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. 2 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 2002. 576 p.

SILVA, R. O.; BATISTOTE, M.; CEREDA, M. P. Wild strains of fermenting yeast isolated of sugar cane juice from an alcohol distillery from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, Ago 2011.

SILVA E. H. *et al.* Avaliação da fermentação de diferentes misturas de caldo de sorgo sacarino e melação para produção de etanol. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química. n. 21, 2016, Fortaleza. Disponível em: <https://proceedings.galoa.com.br/cobeq/cobeq-2016/trabalhos/avaliacao-da-fermentacao-de-diferentes-misturas-de-caldo-de-sorgo-sacarino-e-melaco-para-producao-de?lang=pt-br>. Data de acesso em: 12/2016.

SINGH, D. *et al.* Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 8, p. 753-755, Ago 1998.

SONEGO, J. L. S. **Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono**. 2016. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

SOUZA, C. J. A. *et al.* The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 63-69, Abr 2012.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 2, p. 289-297, Jun 1992.

TONON FILHO, R. J. **Modelagem e simulação em plantas de etanol: uma abordagem técnico-econômica**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

TORIJA, M.J.; BELTRAN, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamon, J.M.; Mas, A.; Rozes, N. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. **Int. J. Food Microbiol**, v. 85, n. 1. p. 127-136, 2003.

TURKENBURG W. C. Renewable Energy Technologies. In: United Nations Development Programme; United Nations Department of Economic and Social Affairs, World Energy Council. **Energy and the challenge of sustainability**. Washington, 2000. p. 219-267.

TYNER, W. E. Policy alternatives for the future biofuels industry. **Journal of Agricultural & Food Industrial Organization**, v. 5, n. 2, 2007.

UFSCar. BADINO, A. C.; CERRI, M. O.; HOKKA, C. O. Sistema reacional pneumático e uso do mesmo. PI0701608-5, 11 Abr 2007.

UNEP. Towards sustainable production and use of resources. Assessing Biofuels. 2009. 118 p.

UNICA. Por que o etanol 2G ainda não decolou? **Revista RPA News**, 07 abr. 2015. Disponível em: <http://www.unica.com.br/na-midia/40837942920315624493/por-que-o-etanol-2g-ainda-nao-decolou/>. Data de acesso em: 04/2016.

UNITED PETROLEUM. Disponível em: <http://www.unitedpetroleum.com.au/ethanol>. Data de acesso em: 04/2016.

US Congress. 1978. National Energy Conservation Policy Act, Public Law 95–619, 95th Congress (1977–78), H.R.5037. Washington (DC): US Congress. Disponível em: <https://www.congress.gov/bill/95th-congress/house-bill/5037>. Data de acesso em: 12/2016.

VANE, L. M. A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 80, p. 603-629, 2005.

VANE, L. M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 2, n. 6, p. 553-588, Dez 2008.

VASCONCELOS, J. N. Ethanol Fermentation. In: SANTOS F.; BORÉM A.; CALDAS C. **Sugarcane. Agricultural production, Bioenergy and ethanol**. Londres: Elsevier, 2015. p.311-329.

VLACHOS, C. E.; MARIOLIS, N. A.; SKARACIS, G. N. A comparison of sweet sorghum and maize as first-generation bioethanol feedstocks in Greece. **Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 5, p. 853-861, Jul 2014.

WALKER, Graeme M. The roles of magnesium in biotechnology. **Critical reviews in biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 311-354, 1994.

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 9, Out 2013.

WANG, L. J.; LUO, Z. L.; SHAHBAZI, A. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 280-291, Mar 2013.

YUE, G. J. *et al.* The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. **Biomass & Bioenergy**, v. 39, p. 48-52, Abr 2012.

ZHANG, Q. *et al.* Substrate and Product Inhibition on Yeast Performance in Ethanol Fermentation. **Energy and Fuel**, v. 29, p. 1019-1027, 2015.

APÊNDICE

Sequenciamento RNA ribossomal da linhagem de *K. marxianus* isolada de processo industrial:

```
AGGGTAATTAGCATTTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATC
GTTTATTTGATAGTTCCTTTACTACATGGATATCTGTGGTAATTCTAGAGCTAATA
CATGCTTAAAATCTCGACCCTTTGGAAGAGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAA
TGTCTTCGGACTCCTTGATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGC
TGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGC
CTACCATGGTTTCAACGGGTAAGGGGGAATAAAGGGTTCGACTCCTGAGAGGGAG
GCCCCTGCACAGGTGCCACATCAGAAGAAGGCTCCACCCGGCACGGGTCTTCAAC
ACTCCTAAAAAAGCAAAATTCCTCCTGCTGGATTGTCTGCTGACGAACCAGCTG
GACGAGACGTCTTCATCCATCATTAATACCTCATCCTCCTGAACGATGCTCCGCTT
CACTTCTGATACCGGACGGATGATCAGGGCTAGCCGTCCTCGTTGTTTTGGAGGT
GTGTCGCCACGGTGACTAGAAGAATTGGGAAACAACCTTCACTTCATGTGTTAGT
GACAAACAAAAAATCTTTTTCTTTTTTTTATTGTTTATTTTTTCATTAATATATCTC
TTCTTTATGTTTTTTTTTCTCCTGCACT
```

Na Figura 31 é possível verificar na coluna Ident a porcentagem de identificação do sequênciada linhagem de *K. marxianus* com outras linhagens que encontram-se no banco de dados da NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Figura 31 - Identificação da linhagem termotolerante de *K. marxianus*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Kluveromyces marxianus strain Y15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	582	582	46%	3e-162	99%
Chain 2, Structure Of The Yeast Kluveromyces Lactis Small Ribosomal Subunit In Complex With The Cricket Paralysis Virus Ires	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces lactis strain JCABKL24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	46%	6e-160	99%
Chain 2, Crnoem Structure Of 40s-eif1-eif1a Preinitiation Complex	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces marxianus DNA, chromosome 5, complete genome, strain: NBRC 1777	575	1150	46%	6e-160	99%
Kluveromyces marxianus strain CCT 7735 (UFV-3) chromosome 5 sequence	575	1150	46%	6e-160	99%
Kluveromyces marxianus DMKU3-1042 DNA, complete genome, chromosome 5	575	1150	46%	6e-160	99%
Kluveromyces sp. CW4.3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	46%	6e-160	99%
Saccharomycetales sp. LM611 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces marxianus 26S ribosomal RNA, 18S ribosomal RNA genes, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp:	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces lactis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces marxianus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces lactis strain NRRL Y-1140 chromosome D complete sequence	575	1726	46%	6e-160	99%
K. marxianus DNA for 18S ribosomal RNA (strain NCYC 970)	575	575	47%	6e-160	98%
K. marxianus DNA for 18S ribosomal RNA (strain 712)	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces dobzhanskii 18S rRNA gene (NCYC 538)	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces lactis 17S rRNA gene	575	575	47%	6e-160	98%
Kluveromyces lactis strain JCABKL9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	573	573	46%	2e-159	99%
Kluveromyces sp. CW3.7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	573	573	46%	2e-159	99%
Kluveromyces marxianus strain Y1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	571	571	46%	7e-159	98%

Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Observa-se na Figura 31 que a linhagem deste trabalho realmente pertence ao gênero *K. marxianus*.