



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Milena Heloisa Pozenatto Bicudo Tognete

A influência da matéria-prima e diferentes cepas de levedura no rendimento fermentativo de um processo de obtenção de etanol

São José do Rio Preto
2017

Milena Heloisa Pozenatto Bicudo Tognete

A influência da matéria-prima e diferentes cepas de levedura no rendimento fermentativo de um processo de obtenção de etanol

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia e Ciência dos Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Campus São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Javier Telis Romero

São José do Rio Preto
2017

Tognete, Milena Heloisa Ponezatto Bicudo.

A influência da matéria-prima e diferentes cepas de levedura no rendimento fermentativo de um processo de obtenção de etanol / Milena Heloisa Ponezatto Bicudo Tognete. - São José do Rio Preto, 2017
121 f.: il.

Orientador: Javier Telis Romero

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Leveduras (Fungos) – Aplicações industriais. 3. Fermentação. 4. Etanol - Indústria. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Milena Heloisa Pozenatto Bicudo Tognete

A influência da matéria-prima e diferentes cepas de levedura no rendimento fermentativo de um processo de obtenção de etanol

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia e Ciência dos Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Campus São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Javier Telis Romero
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia de Carvalho Damy Benedetti
Unilago – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
17 de fevereiro de 2017

*Ao meu querido pai, com
profunda saudades e gratidão por
tudo,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sustentação de todos os dias e por me provar que não devemos pedir dias mais fáceis e sim mais capacidade para evoluir constantemente.

Ao meu orientador Dr. Javier Telis Romero pela oportunidade, dedicação e paciência em me ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu eterno professor e amigo Dr. Silvio Roberto Andrietta pela confiança, apoio incansável, preocupação, aprendizado constante que me proporciona e por sempre acreditar no meu trabalho.

Ao meu esposo Darly, pelo companheirismo, cumplicidade inabalável, amor, paciência e incentivo que me dá em todos os momentos.

Ao meu saudoso pai, meu grande exemplo de vida, por todo o legado deixado, pelo pai singular que foi, por me amar tanto e me ensinar o amor verdadeiro. Gratidão!

Aos meus irmãos e minha mãe pela compreensão nos momentos de ausência e por serem meus maiores fãs. Vocês são meu esteio e minha razão de vida.

Ao Alison, Gerente Industrial da Usina Catanduva, pelo apoio, confiança e por fornecer as condições necessárias ao bom desenvolvimento desse trabalho.

A amiga Gisele Michelin pelo apoio, troca de experiências e disposição incondicional na execução dos experimentos durante muitas madrugadas e dias longos.

A Renata Zecchi e Sandra Belarmino pela dedicação incomparável, precisão meticulosa nas análises laboratoriais e pelo apoio acreditando no propósito do trabalho.

A todas as queridas analistas do laboratório de álcool da Usina Catanduva pelo apoio nas amostragens e composição das amostras para os experimentos e a amiga Roberta Ap. Gambarini, coordenadora dos laboratórios pelo apoio e compreensão habitual.

Aos orientadores da destilaria Pedro Luis Ranzani, Osmair Ottoni e em particular Paulo Elcio Donegá pela paciência na minha ausência durante os períodos de aula do Mestrado, experimentos e principalmente pela maestria com que conduzem as rotinas operacionais. Gratidão por cuidarem da nossa equipe e por fazerem dela a melhor entre as melhores.

Ao CPQBA, em especial a Maria Graça S. Andrietta, pela dedicação na identificação e manutenção das linhagens de leveduras.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz, Prof. Dra. Patrícia de Carvalho Damy Benedetti por aceitarem prontamente o convite para valorosa contribuição deste trabalho.

A equipe da Secretaria de Pós-Graduação, Alex Antônio dos Santos, Rosemar R. de Carvalho Brena e em especial Silvia Emiko Kazama pela paciência e apoio durante esses anos de estudo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar a matéria-prima e sua influência isolada no desempenho do rendimento fermentativo de uma linhagem padrão da levedura CAT-1 testada em 31 meios de cultivos provenientes do processo de fermentação alcoólica da Usina Virgolino de Oliveira – Unidade Catanduva. Os meios foram amostrados e compostos a cada quinzena durante toda as safras 2012 e 2013. O trabalho também tem como finalidade identificar a dinâmica populacional das leveduras do mesmo processo fermentativo, através da diferenciação das linhagens por cariotipagem. As cepas isoladas foram testadas em um meio de cultivo padrão para obtenção das características tecnológicas industriais através da metodologia da Capacidade Fermentativa. Os experimentos de fermentação foram realizados nos laboratórios da Usina Virgolino de Oliveira - Unidade Catanduva em escala reduzida sempre acompanhados de um ensaio padrão utilizando meio de cultivo sintético. O primeiro ponto de estudo consistiu na caracterização da matéria-prima, mosto, e sua capacidade isolada de perturbar o Rendimento Fermentativo. Enquanto que no segundo, onde onze diferentes cepas de levedura foram identificadas ao longo das duas safras, testadas em um mesmo meio de cultivo padrão para obtenção de parâmetros industriais tecnológicos como rendimento em produto (Y_p/s), rendimento em célula (Y_x/s), Velocidade de consumo do substrato (V_{cs}), Produtividade (PROD) e Conversão (CONV) e estudada a influência no Rendimento Fermentativo. O terceiro ponto de estudo foi a comparação entre os rendimentos fermentativos obtidos experimentalmente e os rendimentos fermentativos industriais da Planta. O impacto da presença das cepas com maior rendimento em etanol foi estudado em relação aos valores de rendimento fermentativo industrial. Os resultados mostraram diferenças de desempenho da Cepa Padrão na maioria das quinzenas testadas, o que significa que há variação da matéria-prima ao longo da safra e entre as safras capazes de afetar

rendimento fermentativo. Diferenças de rendimento também foram observadas entre as onze cepas nativas testadas, porém com oscilações menores e menos consideráveis do que com a matéria-prima. Os resultados obtidos em escala reduzida com base nos balanços de massa se apresentaram valores semelhantes em relação aos números de referência o que sugere que a metodologia usada para avaliar a capacidade fermentativa das cepas e a qualidade da matéria-prima foi adequada. Apesar da forte influência dos fatores estudados, não foi possível afirmar, através destes experimentos, qual deles teve papel determinante no impacto do Rendimento Fermentativo. Isso sugere que outros fatores não estudados neste trabalho estão diretamente relacionados que são capazes de influenciar o Rendimento Fermentativo.

Palavras-chave: Rendimento Fermentativo. Levedura. Matéria-prima. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the sucrose mash and its influence isolated on the performance of the Fermentative Yield of a standard strain from CAT-1 yeast tested in 31 different culture medium formulation from the Virgolino de Oliveira Plant – Catanduva Unit alcoholic fermentation process. The culture medium formulation were sampled and composed every fortnight during the whole 2012 and 2013 harvest. The work also has as purpose to evaluate the yeasts population dynamics of the same fermentative process, through the differentiation of the strains by karyotyping. The isolated strains were tested in a standard culture medium to obtain the industrial technological characteristics through the Fermentative Capacity methodology. Fermentation experiments were carried out in mill's laboratories on a reduced scale always accompanied by a standard assay using synthetic culture medium formulation. The first point of study consisted in the characterization of the raw material, sucrose mash, and its isolated capacity to disturb Fermentative Yield. In the second, eleven different strains of yeast identified during the two harvests, they were tested in the same culture medium to obtain industrial technological parameters as Yield in product (Y_p/s), Yield in cell (Y_x/s), Substrate consumption velocity (V_{cs}), Productivity (PROD) and Conversion (CONV) and studied their influence on the Fermentative Yield. The third point of study was the comparison between the fermentative yields obtained experimentally and the industrial fermentative yields of the Plant. The impact of the presence of strains with higher Y_p/s was studied in relation to industrial fermentation yield values. The results showed differences in performance of the Standard Strain in most of the fortnight tested, which means that there is variation of the raw material during the harvest and between the crops capable of affecting fermentative yield. There were also Yield difference observed among the eleven native strains tested, but with smaller and less considerable oscillations than with the raw material.

The results obtained on a reduced scale based on the mass balances were within the range expected in relation to the reference values, which suggests that the methodology used to evaluate the fermentative capacity of the strains and the quality of the raw material was adequate. Despite the strong influence of the studied factors, it was not possible to prove, through these experiments, which one had a determinant role in the Fermentative Yield impact. This suggests that other factors not studied in this work are directly related that are able to influence Fermentative Yield.

Keywords: Fermentative Yield. Yeast. Sucrose mash. Alcoholic Fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Esquema de um Processo de Batelada Alimentada	24
Foto 2.1	Células floculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observadas em microscopia eletrônica de varredura (barra corresponde a 10 µm)	33
Foto 2.2	Células floculantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> da Unidade Catanduva, safra 2012	34
Foto 2.3	Teste de floculação espontânea com leveduras nativas do processo da Usina Catanduva em meio de cultivo sintético	34
Foto 2.4	Floculação causada por bactérias	35
Gráfico 4.1	Correlação entre a %ART experimental e Industrial da safra 2012	67
Gráfico 4.2	Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação Acidez/Brix da safra 2012	69
Gráfico 4.3	Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação ART/Brix da safra 2012	70
Gráfico 4.4	Comparativo entre Rendimentos Experimentais e Industriais da safra 2012	73
Gráfico 4.5	Comparativo entre Rendimentos Experimentais e Industriais de sete quinzenas da safra 2012	74
Gráfico 4.6	Perfil populacional das linhagens ao longo da safra 2012	76
Gráfico 4.7	Perfil de floculação, concentração de células no creme e participação populacional das leveduras nativas no processo em função das quinzenas da safra 2012	80
Gráfico 4.8	Comparação entre os valores de concentração de ART das safras 2012 e 2013	87
Gráfico 4.9	Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação ART/Brix	88
Gráfico 4.10	Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação Acidez/Brix	89
Gráfico 4.11	Correlação entre a %ART experimental e Industrial da safra 2013	89
Gráfico 4.12	Comparativo entre Rendimentos Experimentais e Industriais da safra 2013	95
Gráfico 4.13	Perfil populacional das linhagens ao longo da safra 2013	96

Gráfico 4.14	Perfil de floculação, concentração de células no creme e participação populacional das leveduras nativas no processo em função das quinzenas da safra 2013	100
---------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Características fermentativas das cepas selecionadas comerciais	28
Tabela 2.2	Características fermentativas das Linhagens isoladas	31
Tabela 3.1	Determinação do rendimento fermentativo para avaliação da matéria-prima	50
Tabela 3.2	Limite das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação	57
Tabela 3.3	Valores de referência da base de cálculo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas	58
Tabela 3.4	Determinação do rendimento fermentativo para avaliação das linhagens industriais	59
Tabela 3.5	Parâmetros de referência para ajuste de dados	60
Tabela 4.1	Dados analíticos dos mostos industriais das quinzenas avaliadas da safra 2012	65
Tabela 4.2	Parâmetro de qualidade do melaço	67
Tabela 4.3	Rendimento Fermentativo Experimental Corrigido da Safra 2012	68
Tabela 4.4	Valores de p para os Test T uni-caudal com nível de significância de 95% para amostras com variância presumidamente diferentes da safra 2012	71
Tabela 4.5	Classificação da qualidade da matéria-prima em função dos valores de rendimentos fermentativos experimentais da safra 2012	72
Tabela 4.6	Rendimento Fermentativo Industrial (RFI) da safra 2012	73
Tabela 4.7	Dinâmica Populacional das Linhagens de leveduras do Processo na safra 2012	75
Tabela 4.8	Classificação de floculação das leveduras nativas da safra 2012	80
Tabela 4.9	Valores médios dos parâmetros de caracterização tecnológica da safra 2012 e classificação numérica utilizando Método de Capacidade Fermentativa	82

Tabela 4.10	Rendimento Fermentativo Industrial e participação populacional da Nativa 2 em relação as quinzenas da safra 2012	84
Tabela 4.11	Dados analíticos dos mostos industriais das quinzenas avaliadas safra 2013	86
Tabela 4.12	Rendimento Fermentativo Experimental corrigido da safra 2013	91
Tabela 4.13	Valores de p para o Teste-T uni-caudal com nível de significância de 95% para amostras com variância presumidamente diferentes da safra 2013	92
Tabela 4.14	Classificação da qualidade da matéria-prima em função dos valores de rendimentos fermentativos experimentais da safra 2013.....	93
Tabela 4.15	Rendimento Fermentativo Industrial (RFI) da safra 2013	94
Tabela 4.16	Dinâmica Populacional das Leveduras do Processo na safra	96
Tabela 4.17	Classificação de floculação das leveduras nativas da safra 2012	99
Tabela 4.18	Valores médios dos parâmetros de caracterização tecnológica da safra 2013 e classificação numérica utilizando Método de Capacidade Fermentativa	102
Tabela 4.19	Rendimento Fermentativo Industrial e participação populacional das Nativa e 5 em relação as quinzenas da safra 2013	104
Tabela A.1	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 01 (01-2012)	116
Tabela A.2	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 02 (02-2012)	116
Tabela A.3	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 03 (03-2012)	117
Tabela A.4	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 04 (04-2012)	117
Tabela A.5	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 05 (05-2012)	118
Tabela A.6	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 06 (01-2013)	118
Tabela A.7	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 07 (02-2013)	119
Tabela A.8	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 08 (03-2013)	119
Tabela A.9	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 09 (04-2013)	120
Tabela A.10	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 10 (05-2013)	120
Tabela A.11	Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 11 (06-2013)	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Fermentação alcoólica	20
2.1.1	Processo Batelada Alimentada	22
2.2	O agente da transformação: Leveduras	25
2.2.1	Leveduras Seleccionadas	27
2.2.2	Leveduras Nativas	29
2.2.3	Leveduras Selvagens	30
2.2.4	Leveduras Floculantes	32
2.3	Cariotipagem	36
2.4	Matéria-prima	37
2.4.1	Cana-de-açúcar	37
2.4.2	Caldo de cana	39
2.4.3	Melaço	40
2.5	Rendimento da Fermentação Alcoólica	41
2.5.1	Rendimento Fermentativo por Balanço de Massa	43
2.6	Capacidade Fermentativa	44
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	Ensaio de avaliação da Matéria-prima	46
3.1.1	Inóculo	46
3.1.2	Meio de Cultivo	46
3.1.2.1	Meio padrão ou sintético	46
3.1.2.2	Meio industrial	47
3.1.3	Condução do Ensaio	47
3.1.3.1	Ensaio com meio padrão	47
3.1.3.2	Ensaio com meio industrial	48
3.1.3.3	Descrição dos ensaios	49

3.1.4	Cálculos dos parâmetros de desempenho da linhagem de levedura padrão nos meios industriais e padrão	49
3.1.5	Correção dos valores dos parâmetros de desempenho	50
3.1.6	Delineamento Estatístico	51
3.2	Ensaio para caracterização das Linhagens de Levedura (Capacidade Fermentativa)	52
3.2.1	Linhagens	52
3.2.1.1	Linhagem padrão	52
3.2.1.2	Linhagens industriais	52
3.2.1.2.1	Amostragem	52
3.2.1.2.2	Isolamento das linhagens industriais	53
3.2.1.2.3	Diferenciação das linhagens industriais	53
3.2.2	Condução dos ensaios	53
3.2.2.1	Inoculação	53
3.2.2.2	Meio de cultivo padrão ou sintético	54
3.2.2.3	Ensaio com linhagem padrão	54
3.2.2.4	Ensaio com linhagens industriais	55
3.2.2.5	Descrição dos ensaios	55
3.2.2.6	Floculação	56
3.2.3	Capacidade Fermentativa	56
3.2.4	Cálculos dos parâmetros de desempenho da linhagem de levedura padrão no meio padrão	58
3.2.5	Correção dos valores dos parâmetros de desempenho	60
3.3	Dados industriais	60
3.4	Metodologia Analítica	61
3.4.1	Determinação da Biomassa	61
3.4.2	Determinação de ART no Meio de cultivo - Método Fehling	61
3.4.3	Determinação de ARRT em Vinho Centrifugado - Método Somogy-Nelson	62
3.4.4	3.4.4 Determinação de Etanol em Vinho Centrifugado - Método Densímetro Digital	62

3.4.5	Determinação °Brix em Meio de cultivo - Método refratométrico	62
3.4.6	Determinação da Acidez Sulfúrica no mosto de fermentação e vinho bruto	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
4.1	Safra 2012	64
4.1.1	Etapla 01 – Avaliação da qualidade dos meios de cultivo industriais	64
4.1.1.1	Caracterização da matéria-prima	64
4.1.1.2	Rendimento Fermentativo	68
4.1.1.3	Delineamento estatístico	70
4.1.2	Etapla 02 – Avaliação de desempenho das linhagens industriais da safra 2012	74
4.1.2.1	Dominância e persistência das Linhagens de leveduras isoladas	74
4.1.2.2	Floculação	79
4.1.2.3	Capacidade Fermentativa	81
4.2	Safra 2013	86
4.2.1	Etapla 01 – Avaliação da qualidade dos meios de cultivo industriais	86
4.2.1.1	Caracterização da matéria-prima	86
4.2.1.2	Rendimento Fermentativo	90
4.2.1.3	Delineamento estatístico	91
4.2.2	Etapla 02 – Avaliação de desempenho das linhagens industriais da safra 2013	95
4.2.2.1	Dominância e persistência das Linhagens de leveduras isoladas	95
4.2.2.2	Floculação	99
4.2.2.3	Capacidade Fermentativa	101
5	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO

O etanol à base de cana-de-açúcar tornou-se uma das mais importantes conquistas da sociedade brasileira ao longo do tempo, tanto do ponto de vista econômico, quanto ambiental, como a primeira fonte de energia renovável para transporte do país e, hoje, uma das maiores responsáveis pela redução de emissões de gases de gás carbônico (CO₂).

O processo de produção do etanol no Brasil utiliza a sacarose proveniente da cana-de-açúcar, na forma de caldo de cana e melaço, como substrato para a fermentação.

Por se tratar de um processo bioquímico, a levedura realiza a fermentação do açúcar do substrato com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto deste processo.

Portanto, é fato que a qualidade do meio disponibilizado para a fermentação está diretamente relacionada com o desempenho da levedura, que por sua vez, está associado com a eficiência de conversão.

Grande parte dos estudos acerca de rendimento fermentativo estão relacionados às diferentes cepas de leveduras e seu desempenho, porém pouco se conhece em relação aos impactos da variação de matéria-prima, muito provavelmente pela complexidade do trabalho tendo em vista ser um fator sobre o qual não temos controle, uma vez que dependemos da qualidade da cana, que, por sua vez, depende de fatores climáticos, das características do solo, dos tratos culturais e outros. Além das variações vinculadas à qualidade da cana e das operações do setor agrícola, ainda temos, dentro da própria indústria, fatores que impactam significativamente a qualidade da matéria-prima utilizada na fermentação.

Conhecendo a importância de se avaliar os efeitos da mudança de matéria-prima no comportamento da levedura e a performance das diferentes leveduras nativas que surgem durante a safra, pretende-se neste trabalho avaliar o desempenho de uma Cepa padrão conhecida como CAT-1, por ter sido isolada do processo da Usina Catanduva na safra de 1999, em diferentes matérias-primas proveniente de diferentes períodos de uma

Unidade Industrial ao longo das safras 2012 e 2013 e o impacto dessa variação no Rendimento Fermentativo.

Além disso, é objetivo ainda deste trabalho identificar a dinâmica populacional das linhagens de leveduras e obter os parâmetros tecnológicos industriais das diferentes linhagens encontradas, isoladas de amostras colhidas no mesmo processo e período relacionado ao da matéria-prima, testando sua performance em meio de cultivo padrão. A partir do isolamento das linhagens, é também proposta do estudo verificar as características naturalmente floculantes das cepas testadas, uma vez que é histórico dessa Unidade apresentar floculação irreversível após o início da safra.

Como fechamento do estudo, o Rendimento Fermentativo Industrial das duas safras foi considerado na avaliação em relação aos dados obtidos nos experimentos laboratoriais, de forma a identificar correlação entre eles.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol do mundo e juntamente com os EUA, o primeiro maior produtor, dividem 90% do mercado mundial (NOVA CANA, 2016).

O sistema brasileiro utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima. A sacarose contida na planta é convertida em etanol diretamente pela levedura *S. cerevisiae* sem pré-tratamento enzimático.

É sabido que o rendimento teórico da fermentação alcoólica corresponde a 0,511 gramas de etanol/ gramas de ART consumido, sendo que o grande desafio para as destilarias atualmente está em aumentar o rendimento da fermentação, que na média atual está em torno de 91% (FINGUERUT, 2007).

Nesta safra 2015/2016, o Brasil deve moer um total de 640 milhões de toneladas de cana, divididas entre 34,8 milhões de toneladas de açúcar e 28,4 bilhões de litros de etanol. Isso quer dizer que, em seis anos, a produção de cana no Brasil cresceu pouco mais de 1% ao ano. É ainda mais surpreendente quando constatamos que o crescimento no consumo médio anual de combustível no Brasil, nos últimos dez anos, foi de 7,8% ao ano (CORREA, 2016). Apesar do baixo crescimento, o etanol conta com projeções positivas para os próximos anos, devidas principalmente, ao crescimento do consumo interno. A produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008. O consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros e as exportações em 8,8 bilhões (MAPA, 2017).

2.1 Fermentação alcoólica

A fermentação trata-se de um processo que consiste em um fenômeno biológico, cujo principal agente é a levedura e ocorre através da ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução.

Segundo Oliveira (apud ANDRIETTA, 1994), as primeiras ideias a respeito das causas do fenômeno apareceram por volta do século XIV e XV. Em função da publicação dos trabalhos de Pasteur a partir de 1857 foi aceito definitivamente que o etanol obtido durante a fermentação era produto do metabolismo da levedura.

A levedura absorve sacarose na forma de seus monossacarídeos estruturais - glicose e frutose, após a hidrólise pela exoenzima chamada invertase (AMORIM, 2005).

A utilização de açúcar pelo agente ocorre por duas formas: respiração onde há presença de oxigênio e fermentação, onde há ausência dele. As diferenças que existem entre as duas formas não estão vinculadas apenas ao oxigênio. Na fermentação ocorre a produção de álcool e gás carbônico e produção de duas moléculas de ATP a cada molécula de glicose. Na respiração são produzidas trinta e oito moléculas de ATP, além de água e gás carbônico (ANDRIETTA, 2010).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Sob condições anaeróbias, o piruvato é convertido a etanol com desprendimento de CO₂. Teoricamente, 0,511 é o rendimento para etanol e 0,489 para CO₂ em base mássica, utilizando como substrato uma hexose. Os dois ATP's produzidos na glicólise são usados na condução da biossíntese das leveduras, que envolve diversas biorreações que requerem energia. Portanto, a produção de etanol está fortemente relacionada com o crescimento das leveduras, o que significa que leveduras devem ser produzidas como subproduto. Sem o consumo contínuo de ATP pelo crescimento celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido imediatamente, em razão do acúmulo intracelular de ATP, que inibe a fosfofrutoquinase, uma das mais importantes enzimas reguladoras da glicólise (Bai, Anderson e Moo-Young, citado por PACHECO (2010).

Em termos energéticos, a respiração é um processo muito mais favorável à levedura do que a fermentação. Em condições industriais, a levedura é forçada a utilizar o substrato, glicose e frutose, anaerobicamente, por meio do processo bioquímico glicólise que se constitui de uma série de doze reações enzimáticas partindo da glicose e frutose, cada qual catalisada por enzimas específicas e que ocorre no citoplasma celular.

De acordo com Amorim (2005), os carboidratos ou substratos para a fermentação, podem ser endógenos como o glicogênio e trealose, partes constituintes da

levedura, quanto exógenos como sacarose, glicose e frutose fornecidos ao microrganismo.

Há que se observar que essas enzimas glicolíticas sofrem ações de diversos fatores externos tais como: nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, pH, temperatura, substâncias produzidas no próprio metabolismo, entre outros e que afetam o desempenho do processo.

As cepas mais utilizadas na fabricação de álcool são *Saccharomyces cerevisiae*, bem como suas espécies relacionadas. Entretanto, Andrietta (2010) ainda cita outro microrganismo com grande potencial para produção de etanol, a bactéria *Zymomonas mobilis*, que apresenta algumas vantagens em relação a *S. cerevisiae*, como exemplo a boa tolerância ao etanol e rendimentos próximos ao teórico de 0,511 g etanol/g ART consumido. Contudo, a sensibilidade desses microrganismos a exigência de condições estéreis de mosto e processo torna sua aplicação inviável.

Apesar da existência de diversos tipos de processos de fermentação: Batelada, Batelada simples com cultura pura, Batelada por cortes, Melle-Boinot, Contínuos e Processos com células imobilizadas, os mais utilizados atualmente são: Batelada alimentada e contínuo com reciclo de células.

2.1.1 Processo Batelada Alimentada

Esse processo é uma variante da Batelada e também conhecido como Melle-Boinot, utilizado por 70% das destilarias.

A alimentação do substrato ao reator ocorre parceladamente, por pulsos ou continuamente e a retirada do produto acontece ao final do processo.

O processo se inicia com uma carga de inóculo conhecida industrialmente como fermento ou pé de cuba, com concentração de células de 25 a 35%.

A fonte de açúcar ou substrato para a fermentação, comumente chamada na Indústria de mosto, é alimentado na dorna por um período que varia de 5 a 7 horas em geral. A temperatura do mosto deve ser controlada de forma a atingir no máximo 32°C para que a temperatura dentro da dorna seja mantida entre 32 a 35°C e as condições de

fermentação sejam favorecidas. Além do cuidado com a temperatura, a concentração de açúcar no meio deve ser controlada de forma a não afetar o desempenho da levedura.

Um fator que pode causar queda da viabilidade celular é a concentração de substrato no mosto de fermentação, pois a levedura apresenta uma osmotolerância limitada, por esta razão, fermentações alcoólicas são conduzidas em concentrações de açúcar usualmente menor que 20% (m/v), assim, quando a concentração de açúcar aumenta, o processo deve ser diminuído a fim de prevenir quedas da viabilidade devido a letalidade induzida pelo aumento de etanol produzidas pelas células segundo Lalue, citado por Silva (2012).

De acordo com Crabtree (apud SILVA, 2012):

“A alta concentração de açúcares também pode levar a inibição de enzimas respiratórias por altas taxas de fermentação, levando à produção de etanol na presença de oxigênio, processo denominado Efeito Crabtree”.

Após adição do mosto, tem-se o tempo de espera, que varia de 2 a 4 horas, para que haja toda a conversão do açúcar em etanol. Ao mosto fermentado dá-se o nome de Vinho Bruto, o qual tem-se de 8 a 12 % de concentração de células.

O vinho bruto segue para centrifugação onde o creme de levedura será separado do vinho, o qual é enviado para a destilação com objetivo de obter o etanol como produto final. O creme de levedura é enviado para tanques industrialmente conhecidos como Cuba. Nesse processo efetua-se o tratamento do fermento, recebendo esse nome por ser a etapa onde o fermento será recuperado com a adição de água tanto para hidratação quanto para obter a concentração desejada do pé-de-cuba.

Ácido sulfúrico também é parte do tratamento do fermento e é adicionado com objetivo de reduzir a contaminação bacteriana e ao mesmo tempo levar o pH do meio requerido para a fermentação. Outros insumos como antibióticos, bactericidas, dispersantes e nutrientes são adicionados nessa etapa se for necessário.

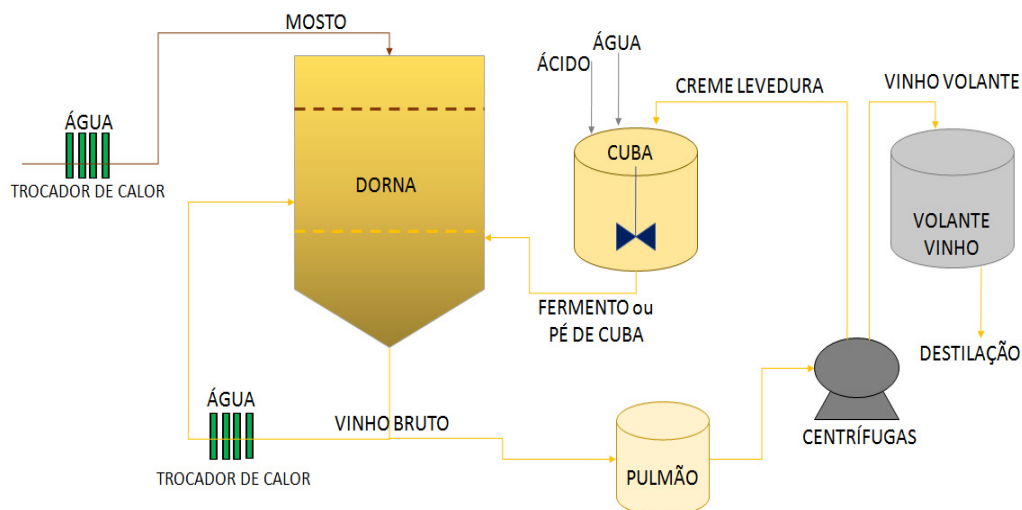


Figura 2.1 - Esquema de um Processo de Batelada Alimentada (Elaborado pelo autor)

Depois da chegada do processo de Melle-Boinot no Brasil, muitas usinas e destilarias iniciaram o processo de substituição do modelo de produção. O processo Melle-Boinot, em batelada alimentada com reciclo de células contribuiu para a evolução da fermentação alcoólica, devido às suas inúmeras vantagens como menor reprodução celular, elevado rendimento em etanol, eliminação dos contaminantes por centrifugação do meio fermentado e por utilização do tratamento ácido e eliminação de preparo de cultura pura devido ao reciclo do fermento (ANDRIETTA, 1994).

De acordo com Amorim (2005), o processo trouxe vários benefícios à fermentação, além de aumentar a eficiência do processo fermentativo, pois com menor quantidade de açúcar se produz maior volume de álcool, uma vez que não mais é necessário desviar uma quantidade de açúcar para produção de células. As desvantagens surgiram com o tempo, quando se descobriu que a centrifugação não eliminava todos os microrganismos como se acreditava no início, separando apenas as bactérias de menor tamanho como *cocos* e *micrococos*. Mesmo com o passar do tempo e as vantagens e desvantagens, o processo Melle-Boinot ainda é o mais usado pelas destilarias brasileiras.

2.2 O agente da transformação: Leveduras

As leveduras formam uma das mais importantes subclasses de fungos. Elas diferem dos bolores por se apresentar na forma unicelular com 2 a 8 micrômetros de diâmetro e 3 a 15 micrômetros de comprimento o qual garante características de maior velocidade de crescimento e de consumo devido a maior relação área/volume (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). Se reproduzem por gemação ou brotamento onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001).

As leveduras não possuem órgãos de locomoção, são organismos eucarióticos, de forma esférica, elíptica ou cilíndrica. As principais microestruturas das células de levedura são: a parede celular, a membrana citoplasmática, o núcleo, os vacúolos e as mitocôndrias. O protoplasma da célula onde estão contidos, o núcleo, o vacúolo e outras organelas é envolvido por uma membrana celular e esta por uma parede. A parede celular é uma espécie de linha que circunda a célula, responsável pela forma que a levedura apresenta e confere rigidez à célula e pode representar 30% da massa seca (AMORIM, 2005).

A parede celular é composta por uma densa camada externa de cerca de 0,05 μm de espessura e camadas menos densas de 0,02 μm . A parte interna é subdividida em três camadas, compostas de polímeros de glicose e manose, com pequenas quantidades de proteínas, lipídios e quitina. A distribuição destes polímeros é variável com as condições de cultivo e representam papel importante no comportamento da levedura no que se refere, por exemplo, à floculação. A *Saccharomyces Cerevisae* apresenta de 6,0 a 8,0% de proteína na parede celular, sendo estas, na sua maioria, enzimas tais como: invertase, fosfatase, amino-peptidase e glucoamilase e de 8,5 a 13,5% de lipídios (ANDRIETTA, 2010).

A membrana citoplasmática, é uma estrutura localizada abaixo da parede e tem a importante função de controlar, de forma seletiva, a entrada de nutrientes e também na regulação da pressão osmótica da célula, além de proteger a levedura da perda de compostos de baixo peso molecular por vazamento do citoplasma (AMORIM, 2005). É no interior da membrana celular que está o citoplasma, onde estão contidos os açúcares,

saís, aminoácidos, lipídeos e outras substâncias necessárias ao metabolismo, bem como a organela celular (ANDRIETTA, 2010).

O núcleo da célula de levedura é uma organela bem definida circundada por uma membrana nuclear semipermeável com funções metabólicas e reprodutivas, além de conter os cromossomos da levedura. É facilmente observado no campo claro do microscópio.

O vacúolo é cercado por uma simples membrana a qual está relacionada ao transporte de substâncias nele armazenadas, como aminoácidos livres, lipídeos e enzimas hidrolíticas.

Segundo Amorim (2005), as mitocôndrias são organelas de membrana limitadas e que estão geralmente bem próximas da periferia da célula e por conter enzimas respiratórias, sua principal função é a de conversão aeróbia de energia. Sob condições de anaerobiose com grandes concentrações de glucose (5 a 10%), as mitocôndrias parecem degenerar, fazendo com que seja reprimida a atividade respiratória e, portanto, a produção de biomassa.

As leveduras *S. cerevisiae* apresentam alta eficiência fermentativa, um crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção, tolerância às altas concentrações de etanol e a baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial (ANDRIETTA, 2010).

As linhagens de levedura presentes em um processo industrial devem apresentar características fermentativas satisfatórias que consistem em converter rapidamente os açúcares em etanol com rendimento satisfatório. O desejo de se encontrar uma linhagem única que apresente um desempenho acima da média que possa ser utilizado em todos os processos, durante toda a safra e para todas as safras, esbarra em algumas características do processo de fermentação alcoólico das destilarias brasileiras. O primeiro deles é que os processos são abertos, do ponto de vista microbiológico, ou seja, não é possível evitar a entrada de microrganismos contaminantes (bactérias e leveduras) às dornas de fermentação. Essa característica permite que ocorra uma disputa entre as linhagens de levedura nativa e as utilizadas como inóculo da safra (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

2.2.1 Leveduras Seleccionadas

As leveduras seleccionadas e comercializadas atualmente foram isoladas de processos industriais, onde as condições operacionais exerciam algum tipo de pressão seletiva (ANDRIETTA, 2010). São adquiridas de forma pura para serem utilizadas como inóculo nas partidas das plantas onde se espera maior rendimento e dominância durante a safra e costumavam receber os nomes referentes às iniciais das unidades industriais onde foram isoladas. As mais conhecidas estão listadas abaixo:

BG-1 (Usina Barra Grande),
CR-1 (Usina Cresciumal),
SA-1 (Usina Santa Adélia),
CAT-1 (Usina Catanduva),
PE-2 (Usina da Pedra),
FT - 858 é a mais recente de todas
FERMEL

Como o objetivo da Indústria é a busca pelo maior rendimento, a concentração de etanol é um dos principais fatores de seleção de linhagens de alto desempenho.

Os métodos de identificação de leveduras no processo, podem ser divididos em três grupos conforme Andrietta (2010) descreve:

1. Taxonômico: baseados em testes bioquímicos de assimilação de diferentes carboidratos e morfológicos.
2. Molecular: baseiam-se nas técnicas de biologia molecular, caracterizando a linhagem através de seu material genético.
3. Tecnológico: buscam classificar as linhagens através de parâmetros vinculados às características de desempenho fermentativo.

Os três possuem vantagens e desvantagens e a escolha depende das necessidades específicas da aplicação.

Segundo Andrietta, Andrietta e Rodrigues (1997) ao estudar as linhagens comerciais SA1, BG1, CAT-1 e PE-2 utilizando a metodologia da Capacidade Fermentativa, obteve os dados da Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Características fermentativas das cepas selecionadas comerciais

Parâmetro	Referência	SA1	BG1	CAT-1	PE-2
Yx/s	0,0400	0,0440	0,0463	0,0409	0,0479
Yp/s	0,4600	0,4665	0,4642	0,4694	0,4637
Prod.	2,5000	2,6579	2,1971	2,5674	2,5113
VCS	5,8000	6,0803	5,0518	5,8369	5,7802
NCO	90,00	93,96	79,07	90,48	89,82
Prod. Esp.	0,4500	0,4420	0,4183	0,4799	0,4042
VCs Esp.	1,0500	0,9535	0,9069	1,0288	0,8772

Fonte: Andrietta, 1997

Yx/s é o rendimento em células (g de células produzidas em massa seca/g ART consumido)

Yp/s é o rendimento em etanol (g de etanol produzido/g ART consumido)

Prod. é a produtividade (g de etanol/Volume de meio x hora)

VCS é a velocidade de consumo de ART (g de ART consumido/ volume de meio x hora)

NCO é o nível de conversão do ART entrado (g ART consumido x 100 / 100 g de ART inicial)

Prod. esp é a produtividade específica (g etanol / Volume de meio x hora x g de célula em massa seca)

VCs esp é a velocidade de consumo do substrato específica (g de ART consumido / volume do meio x hora x g de célula em massa seca)

As quatro linhagens apresentaram rendimento em etanol superior a referência. A linhagem PE-2, que apesar de apresentar um rendimento em célula muito superior ao valor de referência, não teve o valor de rendimento em etanol afetado. Este fato mostra que uma linhagem pode produzir muita massa celular sem que seu rendimento em etanol seja afetado. Essa linhagem foi selecionada a partir de processos industriais e por um programa bem dirigido de seleção de leveduras (BASSO et al., 2008) e foi monitorada usando uma técnica de cariotipagem molecular, selecionada a partir de fermentações industriais, avaliada sob condições de laboratório, e reintroduzida em sua respectiva destilaria durante anos sucessivos, para testar sua fermentação e suas habilidades.

Para Basso et al. (2008), em seus estudos com linhagens de *S. cerevisiae*, utilizou leveduras empregadas na indústria e os dados mostraram que as linhagens PE-2, CAT-1 e a BG-1 apresentaram uma notável capacidade de competir com leveduras selvagens, sobrevivendo e dominando durante fermentações industriais.

A levedura FT 858, selecionada pela Fermentec em 2007 e lançada em 2010, demonstra excelente desempenho. Dentre as suas principais características estão: maior tolerância ao tratamento ácido e às oscilações do processo, tolerância ao alumínio, tolerância a fermentações com alto teor alcoólico, boa recuperação após parada de processo (FERMENTEC, 2015).

A FERMEL®, uma das últimas leveduras lançadas pela Fermentec, possui as características comuns de uma linhagem de alta performance, é especificamente selecionada para fermentações de mostos a base de melaço e água ou melaço e caldo, além da tolerância alto teor alcoólico.

Nenhuma das leveduras selecionadas citadas possuem características floculantes por si só.

2.2.2 Leveduras Nativas

As linhagens nativas são aquelas encontradas no processo, que apresentam características fermentativas satisfatórias, mas são diferentes às selecionadas. Elas surgem espontaneamente durante a safra, se adaptam às condições do meio, competem inclusive com as selecionadas e muitas vezes terminam predominando o meio.

Até meados de 1990, quando ainda não se tinha leveduras selecionadas, era muito comum iniciar a safra com toneladas de inóculo de levedura oriunda da indústria de panificação. Era uma estratégia de partida rápida, porém em poucas semanas de produção havia a substituição por leveduras naturais daquele processo. A quase totalidade das linhagens isoladas de processos fermentativos que trabalham com concentração de etanol acima de 7,0 GL e em concentrações acima de 10^6 UFC/ml apresentam características fermentativas satisfatórias para uso industrial (ANDRIETTA, 2010).

Ultimamente, grande número de linhagens de *Saccharomyces* são isoladas do processo fermentativo das destilarias brasileiras e vêm sendo utilizadas como pré-inóculo em diversas unidades industriais (ANDRIETTA, STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006).

2.2.3 Leveduras Selvagens

Conceitualmente levedura selvagem significa a levedura presente no processo a qual não foi introduzida propositalmente no sistema. Esse termo tem origem na indústria cervejeira que utiliza mostos esterilizados, não devendo conter outra levedura se não aquela inoculada. Num processo de fermentação etanólica, o panorama é diferente e a dorna é vista como um ecossistema no qual a população é composta por leveduras e bactérias (ANDRIETTA, 2010).

A diferença entre nativas e selvagens está nas características fermentativas das selvagens não adequadas ao processo de fermentação alcoólica. São leveduras normalmente não *Saccharomyces* e são consideradas “oportunistas”, pois, somente são capazes de dominar o processo em condições anormais, tais como: operação com baixa concentração de etanol, paradas prolongadas ou sequenciais, etc. Durante as paradas, a introdução de linhagens presentes no caldo ao processo é facilitada, pois, o tratamento de caldo não opera de forma adequada e o caldo pode não atingir a temperatura mínima necessária para matar as leveduras contaminantes presentes no mesmo. Outro problema é que durante as paradas, as linhagens utilizadas no processo sofrem com o longo tempo de estocagem, ainda mais se este não for realizado de forma adequada. Na repartida do processo é que as linhagens selvagens normalmente se instalam, pois, como a linhagem de processo está em péssimas condições, as repartidas são realizadas com baixas concentrações de ART (Açúcares Totais Recuperáveis) no mosto, gerando um vinho com baixa concentração de etanol. Essas leveduras comumente têm baixa tolerância ao etanol, exigem baixas concentrações desta substância para se multiplicar, por isso em fermentações com alto teor etanólico são menos frequentes, o que torna esta condição de processo melhorada, pois a presença destes microrganismos afeta severamente a produção e o rendimento dos processos (ANDRIETTA, 2010).

As espécies selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* são encontradas em caules e colmos da cana-de-açúcar. Esta possui a capacidade de se desenvolver em ambientes diversos, pois pode obter seus nutrientes tanto através da respiração aeróbica, quanto por fermentação. Apresentam como características gerais células dispostas em cadeias,

colônias opacas e superfície crespa. Podem apresentar fenótipos indesejáveis ao processo de fermentação como floculação, formação de espumas, pseudohifas e capacidade para formar biofilme FIGUEIREDO (2008).

Na Tabela 2.2, obtido do estudo de Andrietta (1997), observa-se as características fermentativas de quatro cepas testadas, as leveduras selecionadas CAT-1 e PE-2, nativa, identificada como C1 e selvagem, que chamaremos de C2, ambas encontradas em caldo de cana de uma unidade da região do Nordeste:

Tabela 2.2 - Características fermentativas das Linhagens isoladas

Parâmetro	Referência	CAT-1	PE-2	C1	C2
Yx/s	0,0400	0,0409	0,0479	0,0387	0,1299
Yp/s	0,4600	0,4694	0,4637	0,4552	0,3583
Prod.	2,5000	2,5674	2,5113	2,5313	0,2768
VCS	5,8000	5,8369	5,7802	5,9339	0,8246
Conv.	90,00	90,48	89,82	91,87	13,45
Prod. Esp.	0,4500	0,4799	0,4042	0,4908	0,1154
VCs Esp.	1,0500	1,0288	0,8772	1,0850	0,3240

Fonte: Andrietta, 1997.

As duas linhagens que apresentam rendimento em etanol superior à referência são as selecionadas. Em relação às linhagens C1 e C2, observa-se que a linhagem C1 possui características de uma levedura fermentativa, apesar de apresentar rendimento em etanol abaixo do valor de referência e a linhagem C2, apresentou uma velocidade de fermentação extremamente baixa, com níveis de conversão próximos a 14% e rendimento em etanol de 0,35g de etanol/g de ART consumido. Essas leveduras além do baixo rendimento têm a característica de dominar o processo, e diversos devem ser os cuidados para impedir sua entrada, como: utilizar altas temperaturas no processamento do caldo de cana, assepsia adequada das linhas de produção e temperatura alta das águas de processo, pois, uma vez que esse microrganismo adentra o processo, sua retirada é praticamente impossível e a tendência é a multiplicação (ANDRIETTA, 2010).

Quando da entrada dessas linhagens no processo muitos problemas começam a surgir, como aumento de tempo de residência, diminuição da concentração de álcool, sobra de açúcar residual, aumento do uso de insumos como antiespumante, dispersante, além da deficiência na centrifugação e aumento do uso de ácido sulfúrico, nos casos de leveduras com características floculantes.

Como o rendimento fermentativo é altamente afetado por linhagens selvagens a solução para este problema é a eliminação de todo material em processo, o que evidentemente é um prejuízo a Unidade Industrial.

2.2.4 Leveduras Floculantes

Por ser um assunto relevante e intrigante, muitos autores têm se empenhado nos estudos de floculação e cepas floculantes.

Kamada & Murata, citado por Andrietta (2010) verificaram a intensificação da taxa de floculação de cepas *Saccharomyces* com aumento da temperatura testado de 0 a 30°C, uma drástica inibição do processo entre 50 e 62°C, porém após retornar a uma temperatura inferior a floculação era restabelecida.

A mudança de pH acarreta um profundo efeito na floculação, sendo que o pH ótimo é dependente da cepa do microrganismo (CALLEJA, 1987).

O efeito dos sais na floculação é dependente do tipo de cátion presente como manganês, magnésio e cálcio (SOUZA; TEIXEIRA; MOTA, 1992).

Alcarde (2001) verificou a ocorrência da floculação de leveduras causada por algumas espécies de bactérias contaminantes do processo de produção de etanol.

Segundo Andrietta (2006), componentes genéticos, proteínas, agitação e tensão (stress), produtos da fermentação como etanol, pH e íons metálicos são fatores que exercem influência na floculação.

Stratford, citado por PACHECO (2010) verificou que as células de leveduras se agregam devido às forças de Van der Waals, que na ausência de outro tipo de força atrativa, estas são importantes para que as leveduras superem as forças de repulsão eletrostática entre as células.

Segundo Stan e Despa apud ANDRIETTA (2010), a floculação requer a presença de proteínas e receptores de íons na superfície celular, sendo a floculação uma propriedade intrínseca da parede celular. No entanto, não se sabe como fatores regulatórios agem nos genes envolvidos na produção de proteínas e como estas se tornam receptoras, o que torna cada vez mais intrigante e desafiante para as indústrias.

Conforme observado por Teixeira et al. (1995), algumas características importantes desse processo foram identificadas. Como a floculação é uma interação entre as paredes celulares, íons Ca^{2+} podem induzir o processo, pois estes atuam como cofatores de ativação, enquanto que íons Na^+ tem um efeito inibitório na floculação, assim como alguns tipos de açúcares. Há interação entre células floculantes e não floculantes e as condições do meio de cultivo estão fortemente relacionadas com o aumento da hidrofobicidade da parede celular.

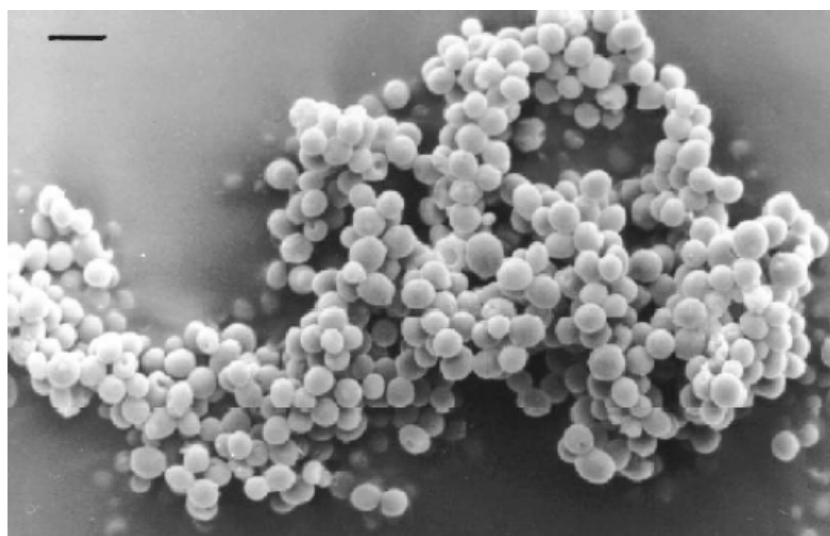


Foto 2.1 - Células floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* observadas em microscopia eletrônica de varredura (barra corresponde a 10 μm) (DOMINGUES, 2001)

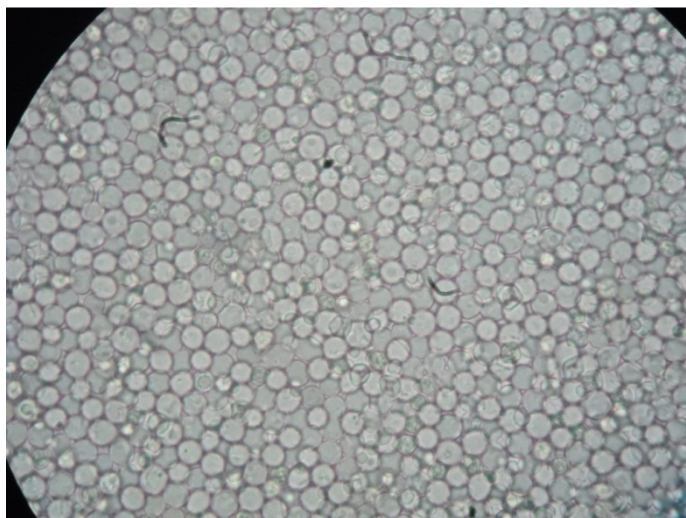


Foto 2.2 - Células floclulantes de *Saccharomyces cerevisiae* da Unidade Catanduva em microscopia, safra 2012 (Fonte: Acervo pessoal)

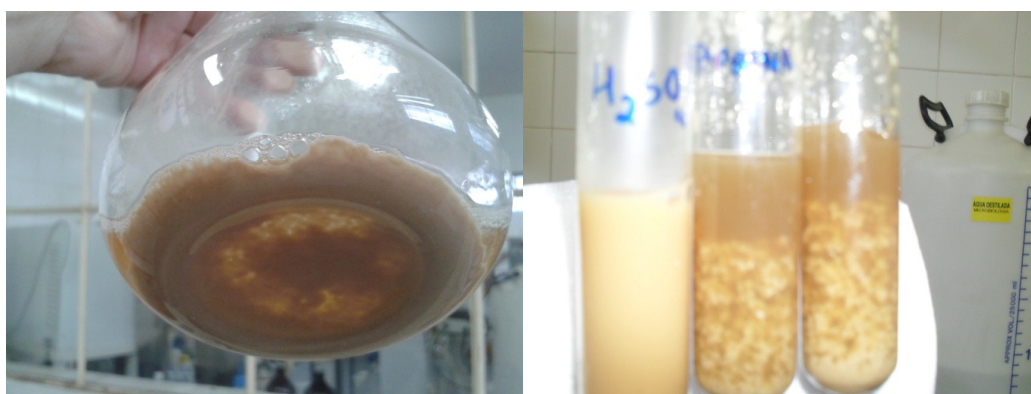


Foto 2.3 - Teste de floclulação espontânea com leveduras nativas do processo da Usina Catanduva em meio de cultivo sintético, safra 2012.

A foto 2.3 demonstra um teste realizado nos laboratórios da Usina com o objetivo de verificar a floclulação espontânea das cepas em processo.

A floclulação de leveduras é um dos piores problemas apresentados para os processos de reciclo de levedura por centrifugação. Linhagens de leveduras floclulantes podem causar vários prejuízos para fermentações industriais com células recicláveis por centrifugação. No processo de fermentação da maioria das destilarias brasileiras, grandes quantidades de biomassa de levedura precisam ser centrifugadas no final de cada ciclo de fermentação. Esta biomassa celular (creme de levedura) é suspendida com água e enviado

para o tratamento com ácido em pH 1,8 a 2,5 durante 1 a 2h antes de retornar para tanques de fermentação e iniciar um novo ciclo. Além disso, as células floculantes podem também decantar na parte inferior dos fermentadores deixando açúcares residuais do vinho sem fermentar e aumentando assim o tempo de fermentação (AMORIM, 2005).

Não é difícil imaginar que a floculação ao reduzir a eficiência de centrifugação, e, conseqüentemente, aumentar o reciclo de vinho no creme de levedura resulta de um creme de levedura menos concentrado e com mais vinho o que significa redução na adição de água para manter a proporção do inóculo em relação ao volume de mosto. Com menor quantidade de água no tratamento, aumenta-se o efeito tampão, o que requer aumento do consumo de ácido sulfúrico do tratamento ácido para reduzir o pH. Por conseguinte, um tratamento ácido estressante por apresentar alta concentração de ácido, além de aumentar a acidez do fermento tratado, o que pode reduzir as atividades das células ou afetar a viabilidade impactando negativamente no rendimento fermentativo.

Um outro problema decorrente da ineficiência da centrifugação causada pela floculação é o retorno de metabólitos inibidores e bactérias ao processo, pois podem acarretar aumento da contaminação para níveis elevados e muitas vezes impossíveis de combater, pois o próprio floco de levedura acaba protegendo as bactérias presentes e agregadas ao floco, impedindo a ação de agentes antibióticos e bactericidas.

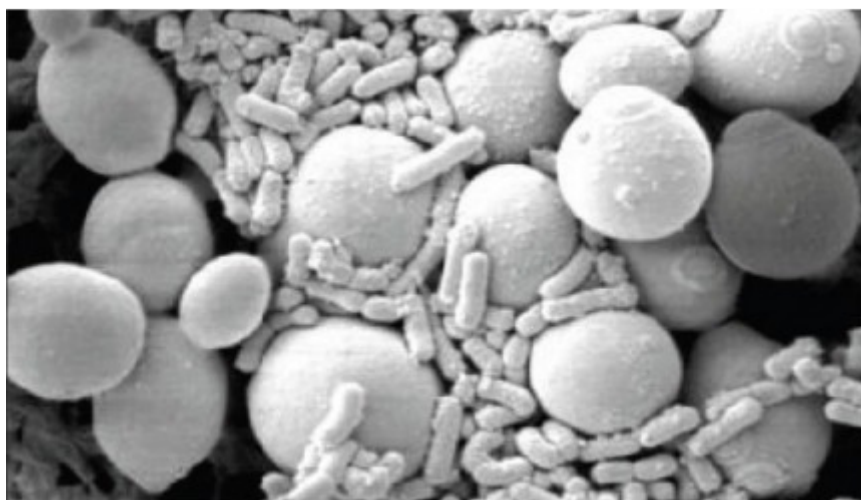


Foto 2.4 - Floculação causada por bactérias. (Fonte: Fermentec, 2005)

Em contraponto, a utilização de leveduras flocculantes como meio de separar naturalmente o vinho do creme de levedura sem utilizar a centrifugação é vista com bons olhos. Essa técnica é muito atraente devido a sua simplicidade e baixo custo, pois após transformar os açúcares em álcool, a levedura se agrega em forma de flocos e concentra-se no fundo do reator. Dessa forma, o vinho poderia ser extraído sem a utilização dos equipamentos de separação e a etapa de reciclo que representam 16% dos custos de processamento e 10% dos custos de instalação. Por isso, muitas pesquisas devem ser feitas para transformar esse processo em um sistema industrial, pois o substrato a ser fermentado (geralmente melaço de cana), contém microrganismos ativos que podem dominar o processo e consequentemente eliminar a cepa flocculante utilizado como inóculo (ANDRIETTA; STECKELBERG E ANDRIETTA, 2006).

2.3 Cariotipagem

Pesquisadores em 1990 estudando várias técnicas moleculares para diferenciar linhagens de *Saccharomyces* concluíram que a impressão digital do cromossomo (chromosome fingerprinter) é a técnica que, segundo esses especialistas, foi àquela capaz de diferenciar um maior número de linhagens de uso industrial. (ANDRIETTA, 2010).

A técnica consiste na remoção da parede celular da levedura com tratamento à base de enzimas que praticamente derrete a célula, mas mantém intacto o DNA contido no interior do seu núcleo (AMORIM, 2005).

Existe um preparo prévio das células com o objetivo de extrair e purificar o DNA existente. O número de cromossomos encontrado em leveduras varia entre os diferentes gêneros. Para a *S. cerevisiae* foram encontrados 16 que variam no tamanho de 150 a 3000 Kb.

O material é transferido para um gel de agarose. A separação é feita em um equipamento que aplica sobre o gel dois campos elétricos que funcionam de forma alternada. Quando ocorre a reorientação do campo elétrico ocorre a separação dos

cromossomos e então eles são corados e fotografados sobre luz UV. O perfil das bandas existentes determina se duas leveduras são iguais ou diferentes. (ANDRIETTA, 2010).

2.4 Matéria-prima

As matérias primas utilizadas nas destilarias brasileiras para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar são: caldo de cana-de-açúcar quando destilarias autônomas, melaço residual da fabricação de açúcar e água ou mistura de melaço, caldo de cana e água.

2.4.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem em sua composição aproximadamente 12-17% de açúcares (90% sacarose, 10% glicose e frutose em massa) e 68 a 73% de umidade (VASCONCELOS, s/ data).

Segundo Amorim (2013), uma cana contaminada com níveis de bactérias acima de 10^5 bact./mL e utilizada numa indústria mal conduzida operacionalmente pode chegar a perdas na ordem de 6,5% em contraponto a 1,9% de perda de açúcar se a mesma for bem operada.

Cana-de-açúcar sadia segundo Stupiello (apud RAVANELLI 2010), significa colmos maduros, recém cortados, sadios e livres de impurezas. Portanto, todos os fatores que danificam suas raízes, os colmos e as folhas da cana, como ataque de pragas, doenças e fatores ligados ao seu manejo são indesejáveis, pois diminuem sua qualidade, podendo acarretar prejuízos no rendimento industrial.

FONTANIELLA et al. (2003), encontraram grandes quantidades dos ácidos ferúlico, siríngico e clorogênico em caldo de cana de açúcar infestada pela "síndrome da folha amarela" (YLF). Phelps & Young (1996) enfatizaram que o ácido ferúlico e seus derivados conferem proteção às plantas contra o ataque de insetos, fungos e vírus. Esses compostos podem afetar negativamente a qualidade da matéria-prima uma vez que são responsáveis pelo escurecimento do caldo e produção de açúcar com mais cor (GODSHALL, 1999), ou ainda atuar como inibidor da fermentação alcoólica, através da

inibição enzimática das invertases (POLAKOVIC et al., 1992) citado por RAVANELLI (2010).

A cana crua tem uma vantagem, que é o tempo curto de corte e moagem, normalmente entre 2 a 5 horas. É uma cana fresca e com baixíssima contaminação, ideal para a fermentação. Entretanto, se o índice de broca ou cigarrinha é significativo, essa contaminação tem um impacto negativo na indústria. Os aspectos negativos da cana crua são a quantidade de folhas e pontas que têm uma alta concentração de amido, fenóis e ácido aconítico, ácido este que vem logo depois dos redutores, em termos de concentração na cana (AMORIM, 2013). Ravanelli (2010) observou em seu estudo que a cana-de-açúcar danificada pela praga cigarrinha-das-raízes possui maior acidez, compostos fenólicos e contaminantes que afetaram negativamente a fermentação.

A presença maciça de microrganismos tem origem no campo, estes adentram nos colmos através das ocorrências de infestação de pragas, danos provocados nos colmos pelas operações de corte/carregamento/transporte, facilitando assim a infecção. O corte de cana contribui significativamente neste contexto, sendo que o corte manual deixa menor área exposta para penetração de microrganismos enquanto que o corte mecanizado aumenta esta área (MUTTON, 2003).

Esta microbiota é levada juntamente com o caldo bruto no momento de sua obtenção através da moagem das plantas. O número de bactérias presentes no caldo pode ser aumentado tanto por tempo prolongado entre o corte e moagem da planta como por insipiente assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material (MUTTON, 2003).

Os microrganismos mais comumente encontrados no caule da cana são bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*, além de bolores e leveduras como *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (GALLO, 1989).

As canas cortadas manualmente na colheita ou danificadas durante a queimada, são particularmente mais suscetíveis ao crescimento de bactérias e leveduras (STECKELBERG, 2001).

A matéria-prima com maiores quantidades de impurezas, seja de origem mineral ou vegetal, influencia nas diversas variáveis do caldo, como Brix (% Sólidos

Solúveis contidos numa solução açucarada), Pol - Polarização (% sacarose contida numa solução açucarada), açúcares redutores, cinzas; na produção global da usina ou destilaria e no aumento dos custos por unidade produzida de açúcar ou álcool. A presença de terra na cana aumenta a ocorrência de bactérias que causam problemas no processo como um todo, mas em especial na fermentação, diminuindo a produção de etanol (AMORIM, 2005).

2.4.2 Caldo de cana

O caldo de cana possui uma pureza em ART que pode variar de 85 a 92%, ou seja, de todo sólido solúvel do caldo apenas de 8 a 15% são sólidos não açúcares. Estes são sais de potássio, cálcio, magnésio, ferro, fósforo, cobre, manganês e zinco, ácidos orgânicos, aminoácidos, biotinas e vitaminas (ANDRIETTA, 2010).

Geralmente, o caldo obtido na extração para produção de etanol é aquecido em torno de 110°C, com o objetivo de reduzir a carga microbiana do mesmo, e em seguida segue para decantação. Em destilarias isoladas pode-se evaporar o caldo para o preparo do mosto e início da fermentação. Já em destilarias, que são anexas à fábrica de açúcar, utiliza-se mel proveniente da centrifugação do açúcar, que contém teor de açúcar acima de 65% m/m para preparo do mosto, sendo diluído com água ou com caldo de cana (WHEALS et al., 1999).

Nos dias de hoje, a fermentação exclusivamente do caldo de cana quase não é uma prática observada nas unidades industriais, exceto em destilarias autônomas. Quando da implantação do Proálcool muitas unidades fermentavam apenas o caldo, mas depois migraram para usinas produtoras de açúcar.

Segundo Amorim (2005), as células de leveduras, durante o processo de fermentação alcoólica, apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente a multiplicação e o crescimento celular e também a eficiência da conversão de açúcar em álcool.

O meio de cultura, além do carbono, hidrogênio e oxigênio, deve igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre,

ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O caldo é considerado uma matéria-prima complexa que possui todos os nutrientes necessários para o crescimento da levedura em anaerobiose. Isto se faz possível porque a produção de células nesta condição é baixa, atingindo rendimentos em células de 0,03 g de massa seca / g de ART consumido. Este valor é pelo menos 15 vezes menor que o rendimento celular atingido pela *Saccharomyces cerevisiae* em aerobiose sem sofrer repressão catabólica. Como a massa de células gerada é baixa, os nutrientes presentes no caldo normalmente são suficientes para suprir suas necessidades (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

2.4.3 Melaço

O melaço é um produto secundário da fabricação de açúcar. Suas características estão intrinsicamente relacionadas as condições operacionais do processo de fabricação de açúcar, equipamentos utilizados, tipo de açúcar produzido entre outros. Trata-se de uma excelente matéria-prima para fermentação, uma vez que, além de conter em média 90° Brix sendo 60% de açúcares redutores, possui outros elementos necessários para que a fermentação ocorra sem a adição de nutrientes.

À medida que ocorre a cristalização do açúcar do mel final, a taxa de cristalização torna-se mais baixa até atingir um ponto em que não se pode mais cristalizar a sacarose a uma dada temperatura, então diz-se que o melaço está esgotado (PAYNE, 1989).

Vários são fatores que influenciam na composição do melaço ou mel final, destacando-se entre eles a natureza da matéria prima, a qualidade da cana processada, os métodos da fabricação do açúcar, o tempo de armazenamento e as regiões de plantio (COPERSUCAR, 1987).

O melaço é constituído principalmente por sacarose, glicose e frutose, sendo que a concentração de não açúcares é maior que quando comparado com o caldo ou xarope que lhe deu origem. Isto se deve ao fato que quando se cristaliza o açúcar, retira-se a sacarose com mais de 99% de pureza, sendo rejeitado para o mel todas as impurezas

não açúcares (ANDRIETTA, 2010). As impurezas não caracterizam um problema a fermentação, ao contrário, são materiais protéicos, sais, vitaminas e outros compostos que as leveduras utilizam como nutrientes necessários ao crescimento celular.

Há relatos de redução na velocidade de fermentação, perda de rendimento e em algumas vezes floculação quando é utilizado somente melaço. Esse fato é explicado, pois com uso apenas de melaço na composição do mosto, há um aumento excessivo da acidez do vinho fermentado associado a uma floculação intensa que está diretamente relacionada com componentes formados durante a fabricação de açúcar por reações secundárias e pela adição dos insumos usados na fábrica.

A utilização de melaço como única fonte de ART no mosto pode acarretar um aumento no poder tampão no fermento a ser tratado, elevando o consumo de ácido, que por sua vez aumenta a acidez do fermento que retorna ao processo (ANDRIETTA, 2010).

Abramov, citado por Tosetto (2002) enfatiza que a síntese de biomassa celular pela levedura é significativamente dependente do conteúdo em nitrogênio no meio de crescimento.

Reed, citado por Tosetto (2002), menciona a respeito da necessidade nutricional de leveduras, a importância de vitaminas como biotina, tiamina, ou outras, que devem ser supridas pelo meio de crescimento. Em experimentos laboratoriais isto é geralmente feito com o uso do extrato de levedura.

2.5 Rendimento da Fermentação Alcoólica

Poucos trabalhos de literatura apresentam metodologia ou cálculos de eficiência da fermentação alcoólica, muito provavelmente pela complexidade do assunto, tendo em vista a dificuldade de medição dos subprodutos e metabólitos relacionados ao metabolismo da levedura na fermentação.

A grande maioria das Usinas realiza o monitoramento da Fermentação pelo Rendimento por subprodutos.

Finguerut (2007), ressalta que o rendimento em etanol é um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado nos processos de uma Usina e devido ao fato da maioria das Usinas não apresentarem um nível de automação razoável, nem realizar medidas

analíticas freqüentes a cada batelada, o rendimento em etanol é atualmente, quase na totalidade das unidades, calculado a partir de subprodutos, segundo metodologia proposta pela então Coopersucar, conforme citado por Fernandes (2003), considerando as quantidades produzidas de levedura, acidez, glicerol, teor alcoólico e considerando os açúcares redutores residuais totais (ARRT).

Em contrapartida, Daré (2008), ao estudar os coeficientes de rendimento fermentativo por subproduto, concluiu que os resultados são mais imprecisos, uma vez que avalia indiretamente a produção de etanol ao considerar outras variáveis, o que aumenta a probabilidade de erros devido à maior necessidade de informações analíticas.

Fernandes (2003), ainda avalia que o modelo de eficiência de fermentação por subprodutos apresenta uma estimativa de eficiência e depende muito da precisão das medidas analíticas necessárias para os cálculos.

Apesar desse rendimento ser usado na Unidade industrial em estudo, nota-se que o rendimento por subproduto não reflete fielmente a realidade do processo, principalmente nos períodos de forte flocculação onde a medição do parâmetro KI, relacionado a produção de biomassa celular, é subestimado pela dificuldade de amostragem e determinação analítica do vinho fermentado na dorna e do vinho centrifugado. Essa falha acaba por superestimar o rendimento e, mesmo em casos de problemas sérios no processo, o rendimento não apresenta diminuição esperada nos valores.

Atualmente, com o aumento do nível de modernização e automação das Usinas, o rendimento fermentativo por balanço de massa começa a ganhar espaço como uma importante ferramenta de controle e acompanhamento do processo.

O desempenho de uma planta de fermentação para produção de etanol a partir de sacarose de cana-de-açúcar baseia-se em um tripé: características das instalações da unidade industrial, da matéria-prima processada e do microrganismo agente empregado (fermento). Para que se atinja um desempenho satisfatório, é necessário o controle das variáveis que formam o tripé. A falha de qualquer uma das variáveis impacta o desempenho do processo como um todo (ANDRIETTA, 2013).

2.5.1 Rendimento Fermentativo por Balanço de Massa

O Rendimento Fermentativo realizado por balanço de massa é a forma mais adequada de se calcular o rendimento fermentativo, pois leva em consideração a massa ou volume de etanol produzido e a massa de ART (açúcares redutores totais) alimentada ao processo, relacionados pelo fator estequiométrico seguindo a definição de rendimento para processos onde ocorrem conversões químicas ou bioquímicas.

Apesar do balanço de massa ser a forma mais adequada para se determinar o rendimento fermentativo, este tipo de cálculo é pouco utilizado nas unidades industriais devido à oscilação observada nos seus valores diários que tem como causas: erro na determinação dos volumes de mosto, vinho e fermento, erros nas análises de concentração de ART e etanol, problemas de amostragem, principalmente do mosto, que podem gerar amostras não representativas e erros na determinação da variação de álcool em processo.

Com o objetivo de diminuir as oscilações do rendimento fermentativo calculado por balanço de massa foi proposto uma forma de cálculo cujo número de variáveis utilizadas na determinação é a menor possível. Neste cálculo, utiliza-se o valor de etanol produzido fornecido pelo controle de produção, cuja medida é muito confiável, pois, se trata da medição de um produto final. Com isto, não é necessário a determinação do volume de vinho e fermento tratado e nem mesmo as análises de etanol nestes produtos para a determinação do volume de álcool produzido na fermentação, que depende somente do volume de álcool produzido, etanol perdido na vinhaça e variação de etanol em processo (BIOCONTAL, 2011).

Para a obtenção da massa de ART alimentada ao processo deve-se determinar o volume de mosto utilizando-se um medidor de vazão volumétrico e a concentração de ART no mosto. Vazão constante de mosto, com um controle adequado do valor de brix auxiliam em muito na diminuição de erros na quantificação da massa de ART alimentado ao processo. Para uma melhor representatividade das amostras, um amostrador ponderado pela vazão deve ser instalado na linha de mosto, permitindo assim, colher amostras por lotes de volume constante de mosto alimentado. Uma outra vantagem desta forma de cálculo está no fato de que a mesma pode ser utilizada para obter o rendimento

fermentativo, tanto de processos operando de forma contínua como batelada alimentada, facilitando assim a comparação entre o desempenho dos dois tipos de processo.

Os cálculos para obtenção do rendimento por balanço de massa estão descritos a seguir:

$$EPF = (PR100 * 100 / RD) \pm VProc \quad (1)$$

EPF – Etanol produzido na fermentação

PR100 – Produção diária de álcool a 100% (m3)

RD - Rendimento da destilaria (%)

VPC - Variação de álcool em processo na fermentação (Hoje – ontem) (m³)

$$MA_ART_FE = (VO_MO * (ART_MO / 100) * D_MO) \quad (2)$$

MA_ART_FE = Massa de ART para fermentação

VO_MO – Volume de mosto acumulado em 24 horas (m3)

D_MO - Densidade do mosto em (ton/m³)

ART_MO – Concentração de ART no mosto (%p/p)

$$EF_FE = EPF * 100 / (MA_ART_FE * 0,6475) \quad (3)$$

2.6 Capacidade Fermentativa

Andrietta (2010) descreve que embora existam várias técnicas de identificação e classificação das leveduras e tenham grande valor para entender a dinâmica populacional das leveduras no processo, a aplicação dessas pelo laboratório como rotina de controle não parece ser a mais indicada. Para isso, devem existir métodos simples, práticos e aplicáveis que possam avaliar as condições do fermento no processo.

A capacidade fermentativa descrita por Andrietta; Migliari, Andrietta (1999), é uma técnica que consiste em determinar as características das leveduras em relação ao seu comportamento cinético (consumo de açúcar, produção de etanol e células). A grande vantagem desse método reside no fato que as informações obtidas são relativas aos atributos industriais da cepa. (ANDRIETTA, 2010).

Os testes são conduzidos com linhagem previamente isolada e submetidas a uma fermentação com meio sintético, temperatura e agitação controladas pelo período de 24 horas. O vinho fermentado, mosto e inóculo são analisados para a determinação dos parâmetros que serão utilizados para a classificação da linhagem.

A classificação das cepas é feita utilizando os parâmetros: Produção específica de células (Y_x/s), Produção específica de etanol (Y_p/s), Velocidade de Consumo de Substrato ART (V_{cs}), Nível de conversão de ART (NCO), Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e Produtividade (PROD).

Silva-Filho (2003), Andrietta (1999) descrevem que a seleção das cepas baseada na capacidade fermentativa separa as leveduras de acordo com parâmetros de produção específica e características de crescimento e foi utilizada na discriminação de leveduras nativas e no acompanhamento de populações de leveduras inoculadas em unidades produtoras de etanol do Estado de São Paulo. Moreira et al. (2013) e Stroppa (2002) também adotaram este procedimento para avaliar o desempenho fermentativo de novas linhagens nativas da *S. cerevisiae* isoladas como contaminantes de destilarias produtoras de etanol.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaios de avaliação da Matéria-prima

3.1.1 Inóculo

Utilizou-se nesta etapa uma cepa padrão, conhecida como CAT-1, disponível comercialmente na forma liofilizada. Esta linhagem é bastante utilizada nas partidas da planta e foi isolada na safra 1998/1999 do processo da Usina Virgolino de Oliveira – Unidade Catanduva, onde foram realizados os ensaios contidos nesta dissertação. Esta foi mantida a 4°C em frasco hermético para evitar a absorção de água pelo material liofilizado.

Do fermento liofilizado pesou-se duas porções de 80g. Transferiu-se cada porção para um erlenmeyers de 500 mL e adicionou ao mesmo 400 mL de água destilada.

Os frascos foram colocados em uma mesa agitadora com temperatura controlada operando nas seguintes condições: 127 rpm e 34°C e mantidos por 1,5 horas até total hidratação da massa de levedura liofilizada.

Ao término deste tempo, coletou-se uma amostra de 10 mL de volume e determinou-se a concentração de células que deveria estar próxima a 40%(v/v). Caso a concentração estivesse muito diferente daquela esperada, a mesma foi corrigida por diluição com água destilada.

3.1.2 Meio de Cultivo

3.1.2.1 Meio padrão ou sintético

Em um becker de 1000 mL, adicionou-se 500 mL de água destilada esterilizada.

Em seguida, adicionou-se 5 g de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), 1g de cloreto de amônia (NH_4Cl), 1g de cloreto de potássio (KCl), 6g de extrato de levedura, 1g de sulfato de magnésio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 200g de sacarose.

Agitou-se e após total dissolução, este material foi transferido para um balão de 1.000 mL, e completou-se o volume com água destilada.

3.1.2.2 Meio industrial

O meio industrial a ser testado foi coletado da linha de alimentação dos fermentadores do processo da Usina Virgolino de Oliveira – Unidade Catanduva, durante as safras 2012 e 2013, utilizando um amostrador contínuo dotado de um temporizador e um sistema de refrigeração para preservação da amostra colhida.

A cada duas horas foram coletados aproximadamente 2 litros do meio dos quais 30 mL foram transferidos para um frasco hermético mantido a -15°C . Ao final de 24 horas, 12 amostras de 30 mL foram adicionadas a este frasco, correspondendo a amostra composta diária.

Ao término do período a ser avaliado (15 dias), 70 mL de cada amostra composta diariamente foram transferidas para outro frasco hermético. Desta forma, ao final do período a ser avaliado, tinha-se aproximadamente 1.000 mL de meio industrial que foi utilizado nos ensaios.

Ao longo da safra 2012, período compreendido entre 23/05/12 a 31/12/12, foram obtidos 15 meios industriais para avaliação e na safra 2013 também 15 meios foram obtidos durante o período de 01/05/13 a 30/11/13.

3.1.3 Condução do Ensaio

3.1.3.1 Ensaios com meio padrão

Para cada ensaio, pesou-se três frascos erlenmeyers de 500 mL identificados numericamente, limpos e secos, com tampa constituída de uma rolha de borracha atravessada por um tubo de vidro em L. Anotou-se o valor do peso obtido (M_{FV}).

Em seguida, utilizando uma proveta graduada de 100 mL, adicionou-se 60 mL do inóculo, preparado como descrito no item 3.1.1, a cada um dos frascos, pesando-os e anotando o valor obtido (M_{FI}).

Adicionou-se a estes frascos, usando-se proveta graduada de 250 mL, 140 mL do meio sintético, preparado como descrito no item 3.1.2.1, pesando-os em seguida e anotando o valor obtido (M_{FM}). Uma amostra do meio padrão foi recolhida para posterior análise de ART (açúcares redutores totais) e sólidos solúveis totais (Brix).

Os frascos erlenmeyers foram incubados a $34^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 127 rpm em mesa agitadora com temperatura controlada. Os frascos em fermentação foram pesados em intervalo de uma hora. A fermentação foi considerada terminada quando não foi mais detectado a liberação de CO_2 , ou seja, os pesos dos frascos permaneceram constantes. Pesou-se os frascos novamente anotando o valor obtido do vinho fermentado (M_{FVF}).

Em seguida, amostras dos três frascos foram recolhidas e delas determinado a concentração de ART residual, etanol e massa seca.

3.1.3.2 Ensaio com meio industrial

Para cada ensaio, pesou-se três frascos erlenmeyers de 500 mL identificados numericamente, limpos e secos, com tampa constituída de uma rolha de borracha atravessada por um tubo de vidro em L. Anotou-se o valor do peso obtido (M_{FV}).

Em seguida, utilizando uma proveta graduada de 100 mL, adicionou-se 60 mL do inóculo, preparado como descrito no item 3.1.1, a cada um dos frascos, pesando-os e anotando o valor obtido (M_{FI}). Uma amostra do inóculo foi recolhida para análise de massa seca.

Adicionou-se a estes frascos, usando-se proveta graduada de 250 mL, 140 mL do meio industrial a ser testado, obtido como descrito no item 3.1.2.2, pesando-os em seguida e anotando o valor obtido (M_{FM}). Uma amostra do meio industrial foi recolhida para posterior análise de ART (açúcares redutores totais) e sólidos solúveis totais (Brix).

Os frascos erlenmeyers foram incubados a $34^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e 127 rpm em mesa agitadora com temperatura controlada. Os frascos em fermentação foram pesados em intervalo de uma hora. A fermentação foi considerada terminada quando não foi mais detectado a liberação de CO_2 , ou seja, os pesos dos frascos permaneceram constantes. Pesou-se os frascos novamente anotando o valor obtido do vinho fermentado (M_{FVF}).

Em seguida, amostras dos três frascos foram recolhidas e delas determinado a concentração de ART residual, etanol e massa seca.

3.1.3.3 Descrição dos ensaios

Em cada grupo de ensaio realizado foram corridos dois ensaios com meios industriais como descrito no item 3.1.3.2 e um ensaio com meio padrão como descrito no item 3.1.3.1.

Como não foi possível testar todos os meios industriais em um único ensaio, utilizou-se os resultados dos testes com meio padrão corridos em cada grupo de ensaio para corrigir possíveis desvios nos resultados de cada grupo causados por fatores não inerentes à variação da qualidade da matéria prima.

Partindo do princípio que os resultados de desempenho obtidos pela linhagem de levedura padrão, crescendo no meio padrão devem ser similares entre si a menos que as condições de cultivo sofram alguma variação, é possível corrigi-las utilizando os desvios obtidos para os ensaios padrões para cada grupo de ensaios. Assim, é possível reduzir desvios ocorridos por outras causas que não estejam relacionadas a qualidade da matéria prima.

3.1.4 Cálculos dos parâmetros de desempenho da linhagem de levedura padrão nos meios industriais e padrão

A qualidade do meio industrial foi determinada através da avaliação do desempenho da linhagem de levedura padrão nos ensaios de fermentação. Para tanto, utilizou-se o parâmetro rendimento fermentativo, considerado o mais importante para determinar se a linhagem é ou não adequada para uso industrial.

Para determinação do rendimento fermentativo, foram analisados a concentração de ART dos mostos industriais e sintético utilizando o método % ART Lane & Eynon (Fermentec, 2014). Do vinho fermentado, foi analisado a concentração de etanol utilizando o método do Densímetro digital (Fermentec, 2014). A partir dos dados obtidos pelas pesagens dos frascos, foi determinado a massa de ART entrada, residual e

consumida, a massa de etanol produzida. O rendimento em etanol das fermentações ensaiadas em escala reduzida considerou o ART total entrado e desprezou o seu ART residual. Os cálculos para a obtenção destes parâmetros se encontram na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Determinação do rendimento fermentativo para avaliação da matéria-prima

Parâmetros	Cálculo	Variáveis
Massa de Fermento (M_{Ft})	$M_{Ft} = M_{FF} - M_{FV}$	M_{FF} – Massa do frasco com fermento M_{FV} – Massa Frasco Vazio
Massa de mosto (M_M)	$M_M = M_{FM} - M_{Ft}$	M_{FM} – Massa fermento com mosto
Massa de vinho fermentado (M_{VF})	$M_{VF} = M_{FVF} - M_{FV}$	M_{FVM} – Massa Frasco com vinho fermentado M_{FV} – Massa frasco vazio
Massa ART Entrado ($MART_{EN}$)	$MART_{EN} = \left(\frac{M_M \times ART_M}{D_M \times 100} \right)$	ART_M – Conc. ART mosto D_M – Densidade mosto
Massa Etanol Vinho (MET_{VF})	$MET_{VF} = \frac{M_{VF} \times P_{VF}}{100} \times 0,79$	P_{VF} – Conc. Etanol no vinho fermentado
Rendimento fermentativo (RE_{FE})	$RE_{FE} = \frac{MET_{PR} \times 100}{MART_{EN} \times 0,511}$	

3.1.5 Correção dos valores dos parâmetros de desempenho

A padronização dos resultados foi feita com base no valor de referência médio do rendimento de fermentação já conhecido experimentalmente para a linhagem CAT-1 no meio padrão, nas condições dos ensaios realizados nesse estudo, o qual é 90%.

Os valores do Rendimento Fermentativo Experimentais, calculados a partir dos meios industriais testados de cada quinzena, foram ajustados a uma mesma base usando um fator de correção (FT) obtido da relação entre a média aritmética dos resultados do rendimento fermentativo de cada ensaio padrão e o rendimento fermentativo do valor de referência.

$$FT = \frac{RF_{padrao}}{RF_{referencia}} \quad (1)$$

$$RF_{corr} = FT \times RF_{ensaio} \quad (2)$$

Dessa forma, os valores de rendimento fermentativo das triplicatas de cada ensaio foram corrigidos a uma mesma base de cálculo permitindo a comparação entre os dados de diferentes ensaios. O desvio padrão foi calculado para os valores corrigidos de cada quinzena testada.

3.1.6 Delineamento estatístico

O delineamento usado para o tratamento dos dados foi o Teste T escolhido por se tratar de avaliação de amostra pequena, número menor que 30, e foram calculados com auxílio do Excel.

A hipótese nula $H_0 = \mu_1 = \mu_2$, ou seja, é válida por assumir que não há diferença significativa entre as médias dos experimentos. Se a hipótese nula for verdadeira, todos os experimentos terão uma média comum, portanto sugere que não há variação considerável de matéria-prima durante os períodos analisados que seja capaz de impactar o rendimento fermentativo.

Utilizou-se o Teste t uni-caudal com variância desigual das duas amostras. O α assumido de 5% é o nível de significância considerado para aceitação ou rejeição da condição.

Para os valores de p encontrados e que estejam abaixo de 0,025, rejeita-se a hipótese nula e assume-se, portanto, que há diferença considerável entre as médias.

3.2 - Ensaios para caracterização das Linhagens de Levedura (Capacidade Fermentativa)

3.2.1. Linhagens

3.2.1.1 Linhagem padrão

Utilizou-se uma cepa padrão, conhecida como CAT-1, disponibilizada em cultura pura pelo CPQBA (Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas) em tubos inclinados e cultura estoque. Como não foi possível testar todas as linhagens de levedura isolada do processo industrial em um único ensaio, para cada bloco de experimento foi realizado um ensaio com essa linhagem para corrigir possíveis desvios ocorridos sem que estivesse relacionado com a característica da linhagem.

3.2.1.2 Linhagens industriais

3.2.1.2.1. Amostragem

As linhagens de levedura do processo industrial da Usina Virgolino de Oliveira – Unidade Catanduva, foram isoladas de amostras quinzenais das safras 2012 e 2013, período compreendido entre 26/04/12 a 31/12/12 e 01/05/13 a 30/11/13.

Uma porção de 100 mL de vinho levedurado foi coletada de cada dorna e cuba em processo e homogeneizada. Desse volume, 20 mL foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com água destilada por duas vezes. Posteriormente, foi diluído em 5 mL de água estéril e então plaqueados para proceder o “isolamento” e identificação das cepas através de técnicas moleculares nos laboratórios do CPQBA/UNICAMP.

3.2.1.2.2. Isolamento das cepas industriais

As amostras foram submetidas a diluição serial e plaqueadas em duplicata no meio diferencial para leveduras WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient medium - DIFCO 0424-17-9), adicionado de antibiótico (100 ppm) para inibição das bactérias. A técnica “semeadura por esgotamento” foi utilizada no plaqueamento. As placas foram incubadas a 32°C por sete dias para seleção das cepas que apresentaram morfologia das colônias diferentes em concentrações acima de 10^6 UFC/mL. As cepas foram diferenciadas seguindo os atributos de tamanho, padrão de cores, aspecto da superfície e contorno (STROPPA, 2002). As cepas de leveduras isoladas foram purificadas em placas usando o meio PDA (Potato-Dextrose Agar) e em seguida foram transferidas para tubos de Agar inclinados, imersos em óleo mineral e mantidos em geladeira a $\pm 4^\circ\text{C}$ para posterior análise de cariotipagem.

3.2.1.2.3 Diferenciação das linhagens industriais

As cepas de leveduras isoladas das amostras industriais foram diferenciadas por análise cromossômica utilizando a técnica CHEF de eletroforese de pulso em gel de agarose, adaptada por Dr. Luis Basso e descrita por Blondin & Vezinhét, citado por Stroppa (2002). A eletroforese foi conduzida em aparelho CHEF III da Bio-Rad. Aquelas que apresentaram diferentes perfis cromossômicos foram isoladas e disponibilizadas em cultura pura pelo CPQBA/UNICAMP em tubos de slant.

3.2.2. Condução do Ensaio

3.2.2.1 Inoculação

Do slant contendo a cultura estoque, preparou-se 6 outros tubos (slants), espalhando pela superfície do meio contido nestes tubos, uma pequena quantidade das células proveniente da cultura estoque, utilizando uma alça de platina.

Estes tubos foram incubados por 48 horas a 32°C. Este procedimento foi realizado tanto para a linhagem padrão como para as linhagens industriais.

As culturas crescidas em tubos inclinados de PDA (Potato Dextrose Agar) por 48 horas a 32°C foram ressuspensas em água estéril e sua concentração corrigida por diluição até fornecer uma concentração de 0,5 g massa seca/L.

3.2.2.2 Meio de Cultivo padrão ou sintético

Em um Becker de 1000 mL, adicionou-se 500 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 5 g de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4), 1 g de Cloreto de amônio (NH_4Cl), 1 g/L Cloreto de potássio (KCl), 6 g de extrato de levedura, 1 g de Sulfato de magnésio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 150 g de sacarose. Agitou-se e após total dissolução, este material foi transferido para um balão de 1.000 mL, e completou-se o volume com água destilada. O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C, por 5 minutos, em autoclave. Um frasco adicional com meio de cultivo esterilizado foi preparado para análise do ART e Brix.

3.2.2.3 Ensaios com linhagem padrão

Para cada ensaio, pesou-se três frascos erlenmeyers de 500 mL identificados numericamente, limpos e secos, com tampa constituída de uma rolha de borracha atravessada por um tubo de vidro em L, anotando-se o valor do peso obtido (M_{FV}).

Foi adicionado 100 mL do meio de cultivo padrão a cada frasco, pesou-se e registrou-se o peso como massa do frasco contendo o meio (M_{FM}).

Utilizando seringas descartáveis, 10 mL da suspensão do inóculo padrão foi transferida para o erlenmeyer contendo o meio, pesando-se e anotando-se o peso como do frasco contendo mosto e inóculo (M_{FMF}). Os frascos inoculados foram incubados em mesa agitadora a 127 rpm com temperatura controlada a 34°C durante 24 horas. Ao final

desse período, os frascos foram pesados novamente, anotando-se o peso como do frasco contendo o vinho fermentado (M_{FVF}).

Uma amostra do inóculo padrão foi recolhida para análise de massa seca utilizando a balança de secagem. Uma amostra de cada frasco fermentado foi recolhida e delas determinado a concentração de ART residual, etanol e massa seca.

3.2.2.4 Ensaios com linhagens industriais

Para cada linhagem ensaiada, pesou-se três frascos erlenmeyers de 500 mL identificados numericamente, limpos e secos, com tampa constituída de uma rolha de borracha atravessada por um tubo de vidro em L, anotando-se o valor do peso obtido (M_{FV}).

Foi adicionado 100 mL do meio de cultivo padrão a cada frasco, pesou-se e registrou-se o peso como massa do frasco contendo o meio (M_{FM}).

Utilizando seringas descartáveis, 10 mL da suspensão do inóculo de cada linhagem a ser testada foi transferida para o erlenmeyer contendo o meio, pesando-se e anotando-se o peso como do frasco contendo mosto e inóculo (M_{FMF}). Os frascos inoculados foram incubados em mesa agitadora a 127 rpm com temperatura controlada a 34°C durante 24 horas. Ao final desse período, os frascos foram pesados novamente, anotando-se o peso como do frasco contendo o vinho fermentado (M_{FVF}).

Uma amostra do inóculo padrão foi recolhida para análise de massa seca utilizando a balança de secagem. Uma amostra de cada frasco fermentado foi recolhida e delas determinado a concentração de ART residual, etanol e massa seca.

3.2.2.5 Descrição dos ensaios

Em cada grupo de ensaio foram corridos três ensaios com linhagens industriais como descrito no item 3.2.2.4 e um ensaio com linhagem padrão como descrito no item 3.2.2.3.

Como não foi possível testar as linhagens industriais em um único ensaio, os testes padrão corridos em cada grupo de ensaio teve como objetivo detectar e corrigir possíveis desvios nos resultados de cada grupo causados por fatores não inerentes à variação da população de linhagens de leveduras.

Partindo do princípio que os resultados de desempenho obtidos pela linhagem de levedura padrão, crescendo no meio padrão, devem ser similares entre si a menos que as condições de cultivo sofram alguma variação, é possível corrigi-las utilizando os desvios obtidos para os ensaios padrões para cada grupo de ensaios. Assim, é possível corrigir desvios ocorridos por outras causas que não estejam relacionadas às diferenças de desempenho das linhagens testadas.

3.2.2.6 Floculação

Ao final dos ensaios de fermentação, foi realizado uma avaliação visual das características de floculação das linhagens testadas, as quais foram classificadas como: ausente (quando não se detecta flocos no meio), leve (flocos finos, aparência de areia dispersos no meio), média (flocos depositados no fundo quando a agitação é cessada) e pesada (flocos grandes com decantação rápida quando a agitação é cessada, formando duas fases).

3.2.3 Capacidade Fermentativa

As cepas isoladas do processo foram classificadas utilizando os parâmetros obtidos nos ensaios de fermentação, utilizando-se a metodologia da Capacidade Fermentativa proposta por (Andrietta; Migliari; Andrietta, 1999), baseado na utilização de seis parâmetros industriais que são: Produção específica de células ($Y_{x/s}$), Velocidade de Consumo de Substrato ART (V_{cs}), Nível de conversão de ART (NCO), Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), Produtividade (PROD) e Produção Específica de Etanol ($Y_{p/s}$).

Cada parâmetro contempla três níveis de valores, sendo alto (1), médio (2) e baixo (3) conforme tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Limite das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação

Nº Parâmetros	Parâmetros	Nível Alto (1)	Nível Médio (2)	Nível Baixo (3)
Primeiro	Y x/s	> 0,044	$0,044 \leq 0,041$	< 0,041
Segundo	VCS	> 5,7	$5,7 \leq 5,2$	< 5,2
Terceiro	NCO	> 98,5	$98,5 \leq 90,0$	< 90
Quarto	$\mu_{\text{máx}}$	> 0,55	$0,55 \leq 0,45$	< 0,45
Quinto	PROD	> 2,4	$2,4 \leq 2,2$	< 2,2
Sexto	Y p/s	> 0,45	$0,45 \leq 0,42$	< 0,42

Fonte: Andrietta et al. (1999)

$Y_{x/s}$ = g massa celular seca produzida / g ART consumido

V_{cs} = g ART consumido / Volume do meio em L x tempo em horas

NCO = % nível de conversão de substrato ART

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

PROD = g de Etanol produzido / Volume do meio em L x tempo em horas

$Y_{p/s}$ = g de etanol produzido / g ART consumido

São consideradas cepas pertencentes ao mesmo grupo aquelas que apresentam a mesma sequência numérica. As cepas foram testadas para obtenção dos parâmetros e seus valores corrigidos para uma mesma base de cálculo, utilizando valores da cepa de referência CAT-1 obtidos em cada ensaio, corrigidos para os valores de referência apresentados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Valores de referência da base de cálculo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas.

Parâmetro	Unidade	Valor de Referência
Produção específica de células	G MS/g substrato	0,04
Velocidade de consumo de substrato	g Subs/ L x h	5,8
Nível de conversão do substrato	%	99,5
Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$)	l/h	0,5
Produtividade (PROD)	g ET/ Lx h	2,5
Produção específica de etanol ($Y_{p/s}$)	G ET/ g substrato	0,46

ANDRIETTA *et al.* (1999).

Para este estudo, o parâmetro velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$), não foi considerado.

3.2.4 Cálculos dos parâmetros de desempenho da linhagem de levedura padrão no meio padrão

A performance das linhagens de leveduras foi determinada através da avaliação dos parâmetros de desempenho fermentativo das linhagens nos ensaios de fermentação reduzida. Para tanto, utilizou-se os parâmetros da capacidade fermentativa, como rendimento em células ($Y_{x/s}$), rendimento em produto ($Y_{p/s}$), Produtividade (PROD), Velocidade de consumo (VCS) e Conversão (NCO).

Estes parâmetros foram obtidos utilizando-se as análises de ART do mosto e vinho fermentado, massa celular do inoculo e do vinho fermentado, a concentração de etanol do vinho fermentado e o peso dos frascos obtidos no ensaio de fermentação reduzida (3.2.2.3 e 3.2.2.4). Os cálculos para a obtenção destes parâmetros se encontram na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Determinação do rendimento fermentativo para avaliação das linhagens industriais

Parâmetros	Cálculo	Variáveis
Massa do Meio (M_M)	$M_M = M_{FM} - M_{FV}$	M_{FM} - Massa Frasco com mosto
Massa de Fermento (M_F)	$M_F = M_{FMF} - M_{FM}$	M_{FV} - Massa frasco vazio M_{FMF} - Massa frasco com mosto e fermento
Massa de vinho fermentado (M_{VF})	$M_{VF} = M_{FVF} - M_{FV}$	M_{FVF} - Massa Frasco com vinho fermentado
Massa ART Entrado ($M_{ART_{EN}}$)	$M_{ART_{EN}} = \left(\frac{M_M \times ART_M}{D_M \times 100} \right)$	ART_M - Conc. ART meio D_M - Densidade meio
Massa ART Residual ($M_{ART_{RES}}$)	$M_{ART_{RES}} = \left(\frac{M_{VF} \times ART_{VF}}{100} \right)$	ART_{VF} - Conc. ART final vinho fermentado
Massa ART Consumido ($M_{ART_{CONS}}$)	$M_{ART_{CONS}} = M_{ART_{EN}} - M_{ART_{RES}}$	
Massa Etanol Produzido (M_{ET})	$M_{ET} = \frac{M_{VF} \times P_{VF}}{100} \times 0,79$	P_{VF} - Conc. Etanol no vinho fermentado
Rendimento em produto ($Y_{p/s}$)	$Y_{p/s} = \frac{M_{ET}}{M_{ART_{CONS}}}$	
Rendimento fermentativo (RE_{FE})	$RE_{FE} = 100 \times \frac{Y_{p/s}}{Y_{t_{p/s}}}$	$Y_{t_{p/s}}$ - rendimento em etanol teórico que equivale a 0,511 g/g
Rendimento em células ($Y_{x/s}$)	$Y_{x/s} = \frac{M_{seca}}{M_{ART_{CONS}}}$	M_{seca} = massa seca analisada do inóculo
Conversão (NCO)	$NCO = \frac{M_{ART_{ENT}} - M_{ART_{RES}}}{M_{ART_{ENT}}}$	
Produtividade (PROD)	$PROD = \frac{M_{ET}}{Vol \times t}$	Vol = volume do meio em litros
Velocidade consumo (V_{cs})	$V_{cs} = \frac{M_{ART_{CONS}}}{Vol \times t}$	t = tempo em horas

3.2.5 Correção dos valores dos parâmetros de desempenho

Os valores do NCO, $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, PROD, V_{cs} , calculados a partir das linhagens de levedura testadas de cada quinzena, foram ajustados a uma mesma base usando um fator de correção (FT) obtido da relação entre a média aritmética dos resultados destes parâmetros de cada ensaio com a linhagem padrão e os valores de referência adotados para cada parâmetro.

Tabela 3.5 – Parâmetros de referência para ajuste de dados

Parâmetros	Fator de correção	Referência	
$Y_{x/s}$	$FT_{Y_{x/s}}$	0,04	$\frac{Y_{x/s_PAD}}{0,04}$
$Y_{p/s}$	$FT_{Y_{p/s}}$	0,46	$\frac{Y_{p/s_PAD}}{0,46}$
Prod	FT_{Prod}	2,5	$\frac{PROD_PAD}{2,5}$
VCS	$FT_{V_{cs}}$	5,8	$\frac{V_{cs_PAD}}{5,8}$
Conv	FT_{NCO}	90	$\frac{NCO_PAD}{90}$

Fonte: Acervo pessoal

Dessa forma, os valores dos parâmetros das triplicatas de cada ensaio foram corrigidos a uma mesma base de cálculo permitindo a comparação entre os dados de diferentes ensaios.

3.3 Dados industriais

Os rendimentos fermentativos industriais (RFI) foram obtidos do Sistema de Dados da Usina Catanduva das safras 2012 e 2013, cuja determinação é realizada por balanço de massa conforme descrito por BIOCONTAL (2011).

3.4 Metodologia Analítica

3.4.1 Determinação da Biomassa

As amostras foram transferidas para um disco de alumínio tarado. Após a secagem do material, o valor da massa seca é obtido pela diferença de peso.

Para determinar a massa celular produzida na fermentação foi utilizado o método direto, que consiste na secagem do material produzido, usando-se uma balança analisadora de umidade por infravermelho, modelo IV 2000, marca GEHAKA.

Foi transferido para um tubo de centrífuga graduado, 10 mL do inóculo usando como medida a própria graduação do tubo. A centrifugação se deu a 3000 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido foi lavado com água destilada duas vezes e transferido para o disco de inox previamente pesado. A secagem é iniciada ao pressionar SIM no visor e o resultado obtido de cada amostra aparece no visor ao final do processo. O valor obtido é dividido por 100.

O mesmo procedimento foi feito para o vinho fermentado das etapas 01 e 02. Para transferir o inóculo da etapa 02, utilizou-se uma seringa descartável graduada para medir 10 mL a cada cepa testada.

3.4.2 Determinação de ART (Açúcar Redutor Total) no Meio de cultivo – Método Lane-Eynon

As análises para determinação dos açúcares redutores totais no mosto foram realizadas utilizando-se a metodologia desenvolvida por Lane-Eynon e adaptada pela Fermentec no Manual de Métodos Analíticos, 5ª edição, 2014.

3.4.3 Determinação de ARRT (Açúcar Redutor Residual Total) em Vinho Centrifugado – Método Somogy-Nelson

As análises para determinação dos açúcares redutores residuais totais no vinho centrifugado foram realizadas utilizando-se a metodologia de Somogy-Nelson e adaptada pela Fermentec no Manual de Métodos Analíticos, 5ª edição, 2014.

O procedimento analítico se baseia na propriedade de alguns açúcares reduzirem o Cu^{+2} em Cu^{+1} . Desta forma, após o preparo da amostra, é realizada a reação de detecção, que consiste em duas etapas. Na primeira é adicionado o reativo de Somogy (contendo Cu^{+2} em meio alcalino). Na segunda etapa é adicionado o reativo de Nelson, que contém o heteropoliácido silico-molibdico que ao ser reduzido produz um complexo colorido azul que é monitorado espectrofotometricamente.

3.4.4 - Determinação de Etanol em Vinho Centrifugado – Método Densímetro Digital

O método baseia-se na extração do etanol presente na amostra através de arraste a vapor na destilação. Em seguida, com a utilização de um densímetro digital, é determinada a densidade da solução hidro alcoólica condensada e, a partir desta constante física, é determinada o teor alcoólico da amostra, compensando o fator de concentração. No densímetro a densidade é determinada pela medida da frequência da oscilação do tubo U preenchido com a amostra, comparada com as frequências de oscilação quando preenchido com água pura.

3.4.5 Determinação °Brix em Meio de cultivo – Método refratométrico

O método se baseia na correlação existente entre a medida do índice de refração de uma solução açucarada e o seu teor de sólidos dissolvidos, seguindo a metodologia do Manual de Métodos Analíticos da Fermentec, 5ª edição, 2014.

3.4.6 Determinação da Acidez Sulfúrica no mosto de fermentação e vinho bruto

O método se baseia na determinação do ponto de neutralização dos ácidos contidos na amostra utilizando solução de NaOH 0,05M, previamente padronizada, e fenolftaleína a 1% como indicador, seguindo a metodologia do Manual de Métodos Analíticos da Fermentec, 5ª edição, 2014. A relação Acidez / °Brix se dá pela divisão entre esses dois parâmetros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizadas 18 fermentações em escala reduzida, sendo 9 da safra 2012 e 9 da safra 2013, referente à Etapa 1 da Caracterização da Matéria-prima.

Em relação à Etapa 02, Avaliação de desempenho das linhagens Industriais, quatro fermentações realizadas entre as duas safras.

Cada experimento da Etapa 01 foi composto de um ensaio padrão e outros dois ensaios das quinzenas testadas, enquanto que na Etapa 02 três ensaios das cepas testadas foram realizados juntamente com um ensaio padrão.

4.1 SAFRA 2012

4.1.1 Etapa 1 – Avaliação da qualidade dos meios de cultivo industriais

4.1.1.1 Caracterização da Matéria-prima

A Tabela 4.1 mostra os valores de concentração de ART, °Brix e Acidez dos mostos industriais de cada quinzena avaliada, assim como as relações Acidez/Brix e ART/Brix.

Tabela 4.1 - Dados analíticos dos mostos industriais das quinzenas avaliadas da safra 2012

SAFRA 2012		° Brix (%p/p)	ART (%p/v)	Acidez (g/L)	Relação ART/BRIX	Relação Acidez/BRIX
Q1	09-23/05/12	21,07	19,43	1,04	92,22	4,94
Q2	01-15/06/12	20,13	18,09	1,27	89,87	6,31
Q3	16-30/06/12	21,50	19,82	1,02	92,19	4,74
Q4	01-15/07/12	19,80	18,45	1,02	93,18	5,15
Q5	16-31/07/12	21,20	19,11	1,14	90,14	5,38
Q6	01-15/08/12	20,60	19,26	1,26	93,50	6,12
Q7	16-31/08/12	21,81	20,71	1,28	94,96	5,87
Q8	01-15/09/12	21,25	20,10	1,21	94,59	5,69
Q9	16-30/09/12	21,44	19,51	1,32	91,00	6,16
Q10	01-15/10/12	21,63	20,92	1,15	96,72	5,32
Q11	16-31/10/12	21,93	20,94	0,79	95,49	3,60
Q12	01-15/11/12	21,28	19,84	1,09	93,23	5,12
Q13	16-30/11/12	21,21	20,46	1,04	96,46	4,90
Q14	01-15/12/12	19,86	17,80	1,24	89,63	6,24
Q15	16-31/12/12	18,01	16,39	0,90	91,00	5,00

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se pelos dados contidos na Tabela 4.1 que existe uma variação significativa das concentrações dos componentes dos mostos coletados nas quinzenas avaliadas. Em relação a concentração de ART, essa variação entre as quinzenas era esperada, pois de acordo com Vasconcelos (s/data), a composição de açúcar na cana-de-açúcar depende do estágio de maturação, condições climáticas, adubação, ferti-irrigação, altura do desponte, tempo entre o corte e processamento, sanidade da cultura, propriedades químicas, físicas e microbiológicas do solo, além da idade do canavial. Valores maiores são esperados no auge da maturação, correspondente ao meio da safra e valores menores no início e fim de safra.

A variação da concentração de açúcar no mosto ocorre não somente em função da qualidade da matéria-prima, mas também devido a sua composição, que está diretamente relacionado ao mix de produção e layout da planta industrial.

Na Unidade em estudo, na maior parte da safra, o mosto é misto, composto por melaço, caldo de cana tratado e água. O mix de produção para açúcar da Usina Catanduva foi de aproximadamente 45% para as duas safras e 30% do ART do mosto constituído por melaço. Portanto, as variações que ocorreram, sejam por conta do processo de fabricação de açúcar ou do mix de produção da planta industrial, relacionam-se diretamente com a composição dos meios testados.

Os dados contidos na Tabela 4.1, geralmente são os dados que se tem disponíveis nas unidades industriais e são utilizados como indicativo de qualidade do mosto. A relação acidez/Brix indica a quantidade de ácidos presentes no mosto em relação ao total de sólidos solúveis. A relação ART/Brix mostra a quantidade de açúcares redutores presentes no mosto em relação a quantidade total de sólidos solúveis.

A quantidade de melaço presente num mosto não implica diretamente em perda ou ganho de rendimento fermentativo, pois em se tratando de matéria-prima, o impacto no rendimento está mais vinculado com a qualidade do melaço e da cana-de-açúcar.

Conforme descrito por Andrietta (2013), o problema do melaço está na presença de grande quantidade de substâncias com capacidade de inibir o desenvolvimento normal da célula de levedura, sendo que uma boa parte delas é gerada na fábrica de açúcar por destruição térmica dos açúcares redutores (glicose e frutose). É previsível que o desempenho de uma unidade operando com um meio industrial composto de uma quantidade maior de melaço não tenha o mesmo desempenho quando opera somente com caldo de cana.

A combinação de fatores como pH, temperatura e tempo de processamento, nas etapas que envolvem aquecimento do caldo, podem desencadear reações secundárias e formar compostos prejudiciais a fermentação, como ácidos orgânicos oriundos da decomposição térmica dos açúcares redutores. Baseado neste fato, assume-se como parâmetro indicativo da qualidade do mel a relação Acidez/ Brix. A tabela 4.2 apresenta as faixas para classificação dos méis de acordo com a relação Acidez/Brix.

Tabela 4.2: Parâmetro de qualidade do melaço

Acidez / % Brix	Classificação do mel
Menor que 5,5	Ótimo
De 5,5 a 6,5	Bom
De 6,5 a 8	Regular
Superior a 8	Ruim

Fonte: Andrietta (2010)

O gráfico 4.1 apresenta a correlação obtida entre os valores de ART experimental e os valores médios obtidos na Planta Industrial nas quinzenas estudadas.

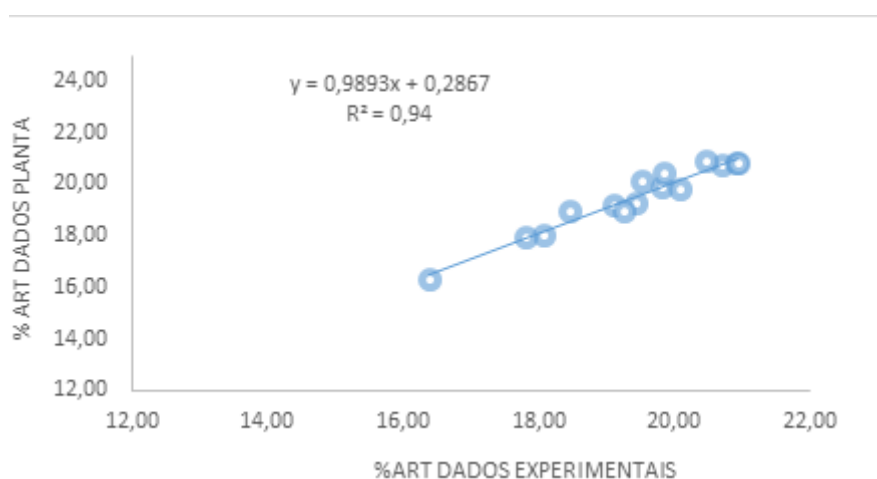


Gráfico 4.1 - Correlação entre a %ART experimental e Industrial da safra 2012

Essa boa correlação entre os dados do gráfico 4.1 evidencia que a metodologia utilizada para coleta e conservação das amostras foi satisfatória representando adequadamente a realidade industrial.

4.1.1.2 Rendimento Fermentativo

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados do Rendimento Fermentativo Experimental dos meios industriais de cada quinzena, corrigidos pelos valores de referência.

Tabela 4.3 - Rendimento Fermentativo Experimental Corrigido da Safra 2012

SAFRA 2012			Ensaio Quinzena - Dados corrigidos				
Quinzena	Período	Fator correção	RF_exp Tri 1	RF_exp Tri 2	RF_exp Tri 3	RF_EXP	Desvio Padrão
Q1	09-23/05/12	0,9863	87,73	87,55	87,51	87,60	0,12
Q2	01-15/06/12	0,9863	90,85	90,45	90,65	90,65	0,20
Q3	16-30/06/12	1,0563	87,83	87,88	88,38	88,03	0,30
Q4	01-15/07/12	1,0563	87,97	88,37	87,63	87,99	0,37
Q5	16-31/07/12	0,9665	88,47	87,88	88,45	88,27	0,33
Q6	01-15/08/12	0,9665	85,86	85,90	86,29	86,02	0,24
Q7	16-31/08/12	1,0193	90,04	90,67	90,74	90,48	0,38
Q8	01-15/09/12	1,0132	91,63	91,92	91,88	91,81	0,16
Q9	16-30/09/12	1,0193	94,51	94,51	94,48	94,50	0,02
Q10	01-15/10/12	0,9794	88,12	88,06	87,87	88,01	0,13
Q11	16-31/10/12	1,0074	89,97	89,61	90,15	89,91	0,27
Q12	01-15/11/12	0,9794	90,58	90,63	90,07	90,42	0,31
Q13	16-30/11/12	0,9848	86,98	87,09	87,04	87,03	0,05
Q14	01-15/12/12	0,9848	89,75	89,90	90,77	90,14	0,55
Q15	16-31/12/12	0,9771	86,36	85,78	86,45	86,20	0,36
Média						89,14	

Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se pelos dados contidos na Tabela 4.3 que o rendimento fermentativo oscilou significativamente para cada quinzena de mosto testado, demonstrando a variação da qualidade da matéria-prima ao longo da safra.

Valores altos de Acidez/Brix indicam a presença de uma maior quantidade de ácidos orgânicos, entre eles está o acético formado pela decomposição térmica dos açúcares durante a fabricação do açúcar. Estes ácidos em pH abaixo de 4,8 exercem uma inibição forte às células de levedura. Assim, quanto maior for a relação acidez/brix, espera-se pior desempenho fermentativo da levedura conforme demonstra a tabela 4.2.

O gráfico 4.2 mostra a correlação entre o rendimento fermentativo experimental e a relação Acidez/Brix, para os dados contidos na tabela 4.1.

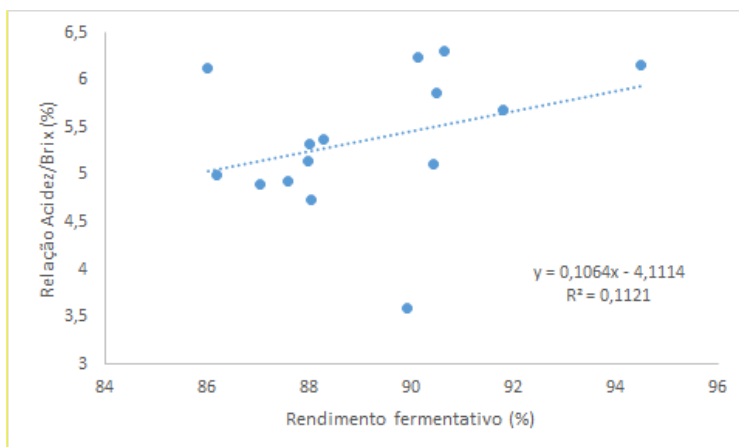


Gráfico 4.2 - Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação Acidez/Brix da safra 2012

Valores baixos da relação ART/Brix indicam que uma maior quantidade de melaço foi utilizada no preparo do mosto. Considerando que o melaço possui uma maior quantidade de substâncias inibidoras das células de levedura em sua composição, é de se esperar um desempenho fermentativo menor, quanto menor for o valor deste parâmetro.

O gráfico 4.3 mostra a correlação entre o rendimento fermentativo experimental e a relação ART/Brix, para os dados contidos na tabela 4.1.

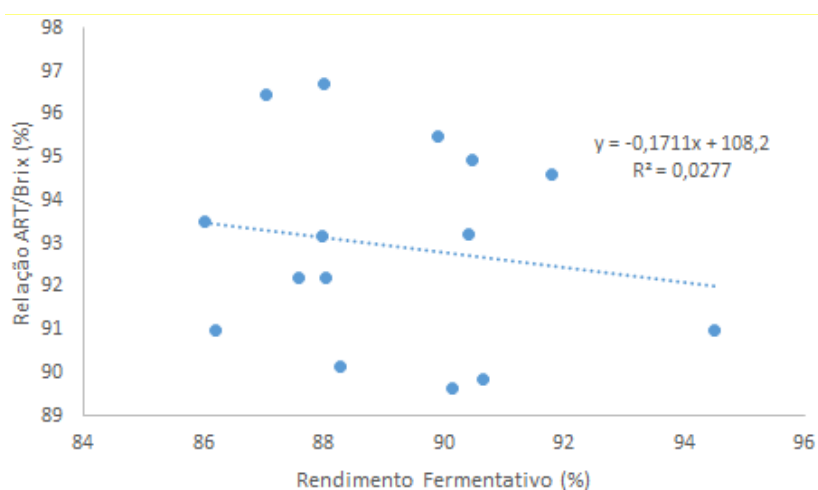


Gráfico 4.3 - Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação ART/Brix da safra 2012

Como se pode observar, não foi possível estabelecer uma correlação entre a variação do valor de rendimento fermentativo e a relações de ART/Brix e Acidez/Brix.

Apesar desses parâmetros serem um indicativo de qualidade fermentativa do mosto, estes não podem ser utilizados sozinhos para classificação da qualidade do mesmo, mostrando que existem outras variáveis que não estão sendo consideradas neste estudo e que foram capazes de interferir significativamente no rendimento fermentativo.

4.1.1.3 Delineamento Estatístico

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de cada quinzena foi realizada utilizando-se o Teste-T, por se tratar de uma comparação de dados relativamente pequena, ou seja, menor que 30. O Teste-T utilizado foi uni-caudal com nível de significância de 95%. Os resultados estão mostrados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Valores de p para os Test T uni-caudal com nível de significância de 95% para amostras com variância presumidamente diferentes da safra 2012.

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15
Q1		0,00004	0,05852	0,09947	0,03007	0,00098	0,00158	0,00000	0,00003	0,00805	0,00066	0,00073	0,00354	0,00608	0,00723
Q2	0,00004		0,00027	0,00077	0,00062	0,00001	0,27682	0,00081	0,00039	0,00006	0,01118	0,17865	0,00024	0,12297	0,00014
Q3	0,05852	0,00027		0,44966	0,20849	0,00053	0,00062	0,00015	0,00035	0,46836	0,00069	0,00034	0,01324	0,00457	0,00144
Q4	0,09947	0,00077	0,44966		0,19917	0,00142	0,00064	0,00044	0,00053	0,46701	0,00136	0,00055	0,02210	0,00364	0,00197
Q5	0,03007	0,00062	0,20849	0,19917		0,00055	0,00089	0,00031	0,00046	0,16117	0,00155	0,00062	0,01071	0,00595	0,00099
Q6	0,00098	0,00001	0,00053	0,00142	0,00055		0,00012	0,00001	0,00012	0,00040	0,00003	0,00003	0,00697	0,00101	0,25633
Q7	0,00158	0,27682	0,00062	0,00064	0,00089	0,00012		0,00798	0,00149	0,00206	0,05539	0,42167	0,00180	0,21608	0,00008
Q8	0,00000	0,00081	0,00015	0,00044	0,00031	0,00001	0,00798		0,00049	0,00000	0,00068	0,00327	0,00005	0,01341	0,00014
Q9	0,00003	0,00039	0,00035	0,00053	0,00046	0,00012	0,00149	0,00049		0,00005	0,00055	0,00094	0,00000	0,00261	0,00031
Q10	0,00805	0,00006	0,46836	0,46701	0,16117	0,00040	0,00206	0,00000	0,00005		0,00096	0,00094	0,00120	0,00858	0,00358
Q11	0,00066	0,01118	0,00069	0,00136	0,00155	0,00003	0,05539	0,00068	0,00055	0,00096		0,04988	0,00110	0,28204	0,00012
Q12	0,00073	0,17865	0,00034	0,00055	0,00062	0,00003	0,42167	0,00327	0,00094	0,00094	0,04988		0,00112	0,24661	0,00006
Q13	0,00354	0,00024	0,01324	0,02210	0,01071	0,00697	0,00180	0,00005	0,00000	0,00120	0,00110	0,00112		0,00489	0,02748
Q14	0,00608	0,12297	0,00457	0,00364	0,00595	0,00101	0,21608	0,01341	0,00261	0,00858	0,28204	0,24661	0,00489		0,00050
Q15	0,00723	0,00014	0,00144	0,00197	0,00099	0,25633	0,00008	0,00014	0,00031	0,00358	0,00012	0,00006	0,02748	0,00050	

Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores destacados em negrito itálico na Tabela 4.4 são aqueles onde o valor de p é maior que 0,025 permitindo que se aceita a hipótese nula H_0 , confirmando que as médias entre as duas quinzenas comparadas são estatisticamente iguais. Nota-se, que cada quinzena apresentou no máximo 4 outras com valor de desempenho similares. Isto comprova que a qualidade da matéria-prima varia ao longo da safra e interfere significativamente no desempenho da linhagem de levedura padrão CAT-1, fazendo variar o Rendimento Fermentativo.

A oitava e nona quinzenas, referentes aos períodos 01 a 30/09/12, são as únicas que não se assemelham com as demais, indicando ter esta matéria-prima melhor qualidade quando comparadas as outras quinzenas. As quinzenas com os menores rendimentos são as 6 e 15, período de 01 a 15/08 e 16 a 31/12, mostrando que nesse período a matéria-prima processada na Usina e destinada a fermentação não foi adequada. A tabela 4.5 apresenta a faixa de valores do Rendimento Fermentativo usada para classificação da qualidade da matéria prima entre baixa, regular, excelente.

Tabela 4.5 – Classificação da qualidade da matéria-prima em função dos valores de rendimentos fermentativos experimentais da safra 2012

Faixa Rendimento (%)	Classificação	Grupo de quinzenas	Percentual (%)
Menor que 88	Baixo	1, 4, 6, 13 e 15	33,3
88 a 90	Regular	3, 5, 10 e 11	26,7
Maior que 90	Excelente	2, 7, 8, 9, 12 e 14	40,0

As quinzenas 2, 7, 8, 9, 12 e 14 apresentam rendimento fermentativo superior ao padrão de referência – 90%. As quinzenas 01, 04, 06, 13 e 15 estão classificadas como períodos de baixo rendimento fermentativo, enquanto que os ensaios das quinzenas 03, 05, 10 e 11 apresentaram resultados regulares. Apesar da maior parte dos rendimentos fermentativos experimentais estarem classificados abaixo de regular, 40% dos ensaios foi considerado como excelente, obtendo resultado acima do padrão de referência.

A tabela 4.6 apresenta os dados industriais de Rendimento Fermentativo da Usina Catanduva no período estudado.

Tabela 4.6 - Rendimento Fermentativo Industrial (RFI) da safra 2012

Quinzenas	Período	% RFI
Q1	09-23/05/12	88,88
Q2	01-15/06/12	93,12
Q3	16-30/06/12	88,15
Q4	01-15/07/12	88,03
Q5	16-31/07/12	90,34
Q6	01-15/08/12	87,64
Q7	16-31/08/12	93,57
Q8	01-15/09/12	87,73
Q9	16-30/09/12	86,85
Q10	01-15/10/12	89,21
Q11	16-31/10/12	94,59
Q12	01-15/11/12	86,85
Q13	16-30/11/12	85,20
Q14	01-15/12/12	84,84
Q15	16-31/12/12	118,73
Média		88,93

O último ponto do Rendimento Fermentativo Industrial de 2012 foi desconsiderado da análise, pois se trata de esgotamento do processo no fim da safra.

Apesar da boa representatividade das amostras coletadas para o experimento como mostrado no gráfico 4.1, não se observou correlação significativa entre o rendimento fermentativo experimental e o rendimento fermentativo industrial quando comparadas todas as quinzenas da safra de 2012 conforme mostra o gráfico 4.4.

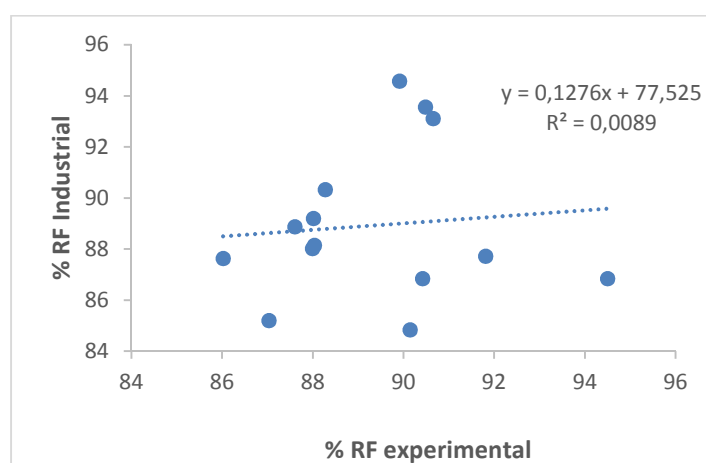


Gráfico 4.4 – Comparativo entre Rendimentos Experimentais e Industriais da safra 2012

Porém, ao se avaliar somente as sete primeiras quinzenas, nota-se que existe uma correlação de 85% entre os rendimentos fermentativos obtidos experimentalmente e os dados industriais de planta como pode ser visto no gráfico 4.5. Este fato indica que outros fatores, nas demais quinzenas, estão interferindo no Rendimento Fermentativo Industrial e que não estão relacionados a matéria-prima.

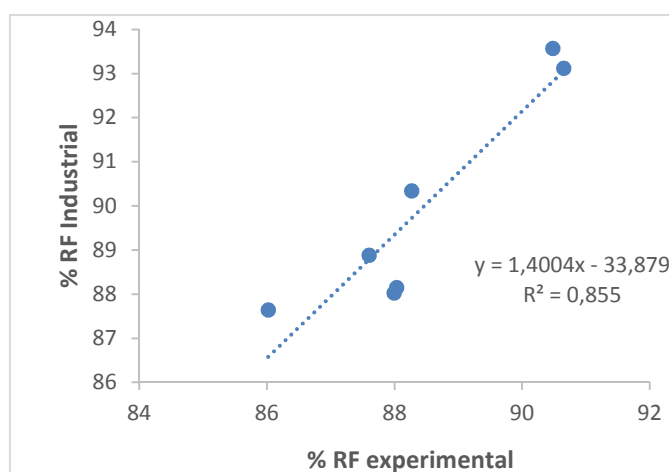


Gráfico 4.5 – Comparativo entre Rendimentos Experimentais e Industriais de sete quinzenas

Não se pretende com esse estudo, encontrar as causas das oscilações de Rendimento Fermentativo nas diferentes matérias-primas analisadas, mas apenas demonstrar que a qualidade da matéria-prima afeta significativamente a performance da levedura.

4.1.2 Etapa 02 – Avaliação de desempenho das linhagens Industriais da safra 2012

4.1.2.1 Dominância e Persistência das Linhagens de Leveduras isoladas

A safra 2012 da Usina Catanduva foi iniciada com 300 kg de leveduras selecionadas, sendo 150 kg PE-2 e 150 kg CAT-1.

Após isolados nas placas de WLN, os biótipos que apresentaram morfologia de colônia diferentes foram isolados e submetidos a análise de cariotipagem. Os testes resultaram no isolamento de 7 linhagens de levedura distintas na safra 2012, em

concentração superior a 10^6 UFC/ml, sendo 5 nativas e 2 selecionadas. A Tabela 4.7 apresenta a dinâmica populacional destas linhagens identificadas no processo em cada quinzena e o gráfico 4.6 ilustra essa dinâmica.

Tabela 4.7: Dinâmica Populacional das Linhagens de leveduras do Processo na safra 2012

Safra 2012	Data coleta	PE-2	CAT-1	Nativa 1	Nativa 2	Nativa 3	Nativa 4	Nativa 5
Quinzena 1	26/04/2012	80,6	19,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 2	10/05/2012	90,1	9,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 3	05/06/2012	93,6	6,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 4	18/06/2012	91,7	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 5	02/07/2012	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 6	16/07/2012	20,0	0,0	53,3	26,7	0,0	0,0	0,0
Quinzena 7	02/08/2012	15,0	0,0	50,0	35,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 8	20/08/2012	16,9	16,9	0,0	66,2	0,0	0,0	0,0
Quinzena 9	03/09/2012	65,2	0,0	0,0	0,0	34,8	0,0	0,0
Quinzena 10	16/09/2012	0,0	0,0	42,9	0,0	57,1	0,0	0,0
Quinzena 11	04/10/2012	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Quinzena 12	15/10/2012	0,0	0,0	0,0	41,7	58,3	0,0	0,0
Quinzena 13	01/11/2012	23,1	0,0	0,0	23,1	53,8	0,0	0,0
Quinzena 14	26/11/2012	22,2	16,7	0,0	2,8	5,6	55,4	0,0
Quinzena 15	03/12/2012	18,6	69,8	0,0	0,0	11,6	0,0	0,0
Quinzena 16	19/12/2012	0,0	0,0	0,0	69,2	0,0	0,0	30,8
Quinzena 17	31/12/2012	55,5	0,0	0,0	0,0	45,5	0,0	0,0

Fonte: Elaborado pelo autor

O Gráfico 4.6 mostra os perfis de permanência de cada linhagem ao longo da safra 2012.

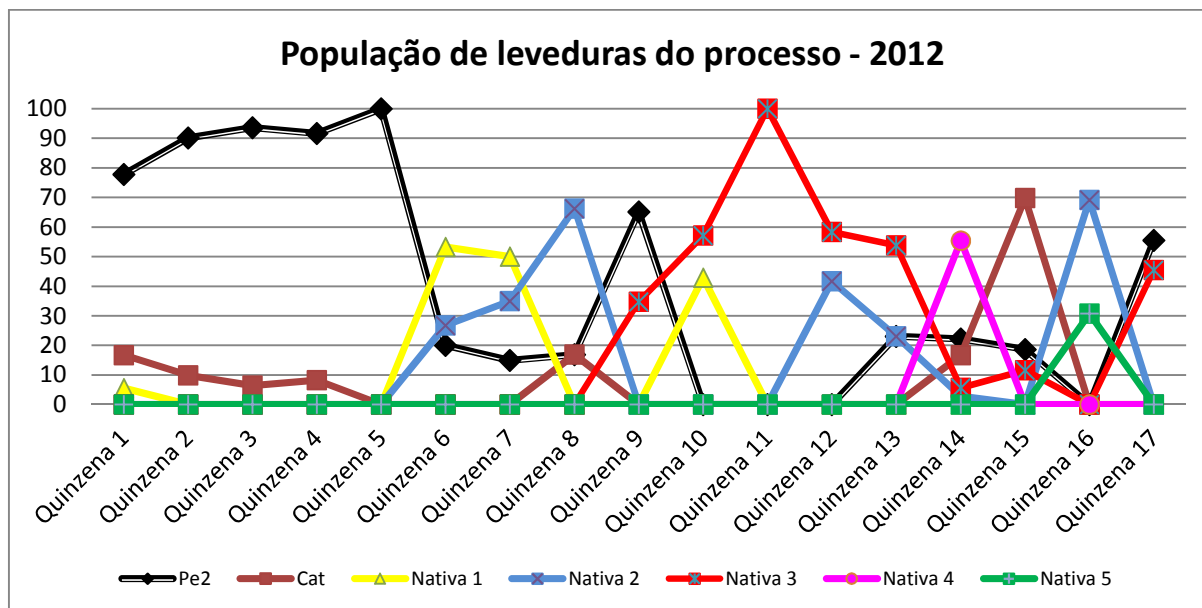


Gráfico 4.6: Perfil populacional das linhagens ao longo da safra 2012

Observa-se que nas cinco primeiras quinzenas da safra a população de levedura no processo é constituída 100% por leveduras selecionadas, PE-2 e CAT-1. Esse fato inicialmente era esperado, pois estas linhagens foram aquelas usadas como inóculo.

A linhagem CAT-1 mostrou uma capacidade de adaptação às condições industriais menor do que a PE-2, pois sua participação populacional reduziu a cada quinzena, atingindo concentrações inferiores a 10^6 UFC/ml na coleta de 02/07/12. A PE-2 mostrou uma forte dominância e persistência, pois apareceu em mais de 76% das quinzenas estudadas.

Esse fato é explicado por Andrietta et al. (2011b) ao afirmar que a linhagem PE-2 é uma levedura que tem a capacidade de permanecer, embora nem sempre como dominante, em grande parte das destilarias brasileiras em que é usada como inóculo. A sua capacidade de dominância do processo parece estar ligada ao alto rendimento em célula Yx/s e à alta velocidade de consumo de substrato apresentado por essa linhagem. Argueso & Pereira (2009) atribuem essa permanência à sua complexidade genômica, a qual permite a adaptação desta ao ambiente industrial.

O fato de algumas linhagens aparecerem em uma quinzena, não serem detectadas em outras e voltarem a aparecer em quinzenas subsequentes está vinculado também a limitação do método de isolamento dos biótipos no plaqueamento das amostras

que somente permite a detecção de linhagens acima da concentração de 10^6 UFC/ml. A não detecção de certas linhagens em algumas quinzenas não significa que a mesma foi eliminada do processo, pois, ela pode estar em concentrações inferiores a 10^6 UFC/ml.

Andrietta (2011b) enfatiza que a diversidade de linhagens de leveduras encontradas nos diferentes processos de fermentação indica não existir um único fator responsável pela instalação e permanência de uma linhagem de levedura, mas sim de uma série de variáveis que somadas são os determinantes para a seleção e dinâmica da população das leveduras de processo que é única para cada um dos processos.

Vicente, citado por Andrietta (2010) descrevem que as leveduras habitantes naturais do caldo são potencialmente as candidatas a dominarem a biomassa das dornas de produção de bioetanol. Considerando o processo de obtenção da cachaça, onde não existe a introdução do inóculo no início das atividades, pode-se elucidar como as leveduras nativas dominam o processo de etanol. Na fermentação da cachaça, é feita uma mistura de milho, suco de limão, arroz e amido e essa mistura sofre uma fermentação espontânea com duração de 12 a 24 horas. Caldo de cana é então adicionado a essa mistura até que seja observada a liberação de CO_2 , indicativos de que linhagens de leveduras nativas estão presentes e serão responsáveis pela produção da bebida.

As linhagens selecionadas que conhecemos e citadas anteriormente, são leveduras nativas que foram isoladas de unidades produtoras. Basso et al. (1993), em seu trabalho sobre a dominância de leveduras contaminantes constatou que as leveduras utilizadas como inóculo são completamente substituídas por leveduras nativas ainda no início da safra. Constatou-se ainda que a única levedura com capacidade de permanecer no processo é a isolada de safras anteriores. Sendo assim, seria de se esperar que a cepa CAT-1, oriunda da Usina Catanduva e usada como padrão nesse trabalho, teria a dominância do processo da Usina em estudo o qual, conforme observamos pelos resultados, não aconteceu.

Mesmo a CAT-1 tendo sido isolada do processo da Usina Catanduva na safra 1998/1999, esta não foi capaz de dominar o processo por longos períodos.

Apesar da identificação de 7 cepas no processo, 5 nativas e 2 selecionadas, na maioria das quinzenas, a população foi constituída de 2 a 3 linhagens de leveduras o que corrobora com estudo de Andrietta (2011b) ao inferir a flutuação da dinâmica

populacional às características da matéria-prima processada e das condições operacionais. A dominância de um único isolado aconteceu em apenas duas coletas, sendo na 5^o constituído pela PE-2 e 11^o pela Nativa 3.

A Nativa 1 aparece em apenas 3 coletas, das quais mostra-se dominante (população acima de 40%) em 66,7% dos casos. A Nativa 2 aparece em 41,2% das coletas, porém de forma menos agressiva que a Nativa 03. Essa cepa foi a que apresentou a capacidade de se instalar, dominar e permanecer por um tempo maior no processo entre as nativas, detectada em 8 das 17 coletas. A presença da Nativa 03 foi a responsável pela “eliminação” da PE-2, nos períodos que ela dominou, pois na primeira vez que ela aparece conta com participação populacional acima de 30%, progredindo nas quinzenas subsequentes até dominar totalmente o processo. A partir daí ela persiste até o fim da safra, deixando de ser detectada apenas na 16^o coleta.

As Nativas 4 e 5 apareceram em uma única quinzena, respectivamente 14^o e 16^o quinzenas e com participação populacional consideráveis, 55 e 30,8% respectivamente.

Andrietta (2010) relata que as condições do meio pode ser uma das explicações da não permanência de uma mesma linhagem durante a safra e entre as safras. Elas surgem espontaneamente, se adaptam às condições do processo, competem inclusive com as selecionadas e muitas vezes terminam predominando o meio. Por ser um fato comum nas destilarias brasileiras, muitos estudos são desenvolvidos com o objetivo de caracterizar as diferentes cepas que surgem, porém muito pouco se conhece em relação às causas.

A presença de mais de uma linhagem em processo não deve ser vista como algo negativo, pois, em caso de variações repentinas das condições operacionais, uma das linhagens presentes pode se adequar melhor às novas condições e manter o processo funcionando (ANDRIETTA, 2013).

Ducan, apud ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA (2006) citam que a cana-de-açúcar sadia carrega níveis de 10^3 a 10^4 de fungo por grama de planta e existem trabalhos que evidenciam a presença dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*.

Um outro ponto importante a ser observado neste trabalho é que apesar dos procedimentos de amostragem terem sido padronizados conforme explicado no item

3.2.1.2, a retirada das amostras do processo ter sido elaborado de forma a contemplar todo o volume do fermento em operação no ato da coleta, entende-se que pode não ter sido tão representativo uma vez que estamos avaliando um processo composto por dois ciclos de sete bateladas de fermentação com aproximadamente 800.000L de vinho bruto cada batelada, ou seja, uma pequena alíquota para representar de maneira instantânea um processo dessa dimensão.

4.1.2.2 Floculação

Conforme descrito por Andrietta (2010), a floculação é um fenômeno em que células de leveduras aderem-se umas às outras formando aglomerados (flocos) que se sedimentam rapidamente no meio em que estão suspenso. É considerado como uma estratégia de sobrevivência, sendo que as células localizadas na periferia do floco protegem as que estão no centro contra as condições desfavoráveis do meio. É interessante ressaltar que diferentes perfis de floculação são observados entre as linhagens. Existem algumas que flutuam como algodão no meio da fermentação, outras formam "pellet" e existem ainda leveduras floculantes que apenas decantam rapidamente quando em repouso, sem que a propriedade de floculação seja percebida quando em agitação. O processo de floculação pode ser causado por fenômenos biológicos, químicos e físicos podendo sofrer interferência de fatores externos ou simplesmente ser uma característica da própria levedura (ANDRIETTA, 2010).

Neste estudo, os níveis de floculação das linhagens de leveduras foram determinados por avaliação visual da massa celular contida no vinho fermentado obtido nos ensaios de fermentação utilizados para a determinação das características tecnológicas das mesmas. O meio utilizado nos experimentos possui baixa concentração de cálcio que por si só não seria suficiente para provocar a floculação no microrganismo quando a mesma é dependente de cálcio. Assim, as floculações observadas neste trabalho seguiram outro mecanismo e são características intrínsecas das cepas.

Tabela 4.8 - Classificação de floculação das leveduras nativas da safra 2012

Padrão CAT-1	01-2012	02-2012	03-2012	04-2012	05-2012
Ausente	Leve	Leve	Média	Pesada	Pesada

Com base nos dados contidos na Tabela 4.8, conclui-se que todas as leveduras nativas identificadas no processo de fermentação são naturalmente floculantes.

Em comparação com os dados reais da planta industrial, a entrada das linhagens de leveduras floculantes é percebida através de variáveis de controle da operação que são: diminuição da % de fermento do creme de levedura nas separadoras centrífugas e aumento da % de floculação do vinho levedurado, ambas detectados por análise físico-química e microbiológica.

Observa-se, no gráfico 4.7, que após a quinzena 6, há aumento significativo da floculação e redução na concentração de fermento no creme de levedura. Esse período corresponde a 16/07/12, onde foi observado a entrada das leveduras nativas. A floculação das células de levedura no processo industrial persistiu até o fim da safra, assim como a presença das nativas.

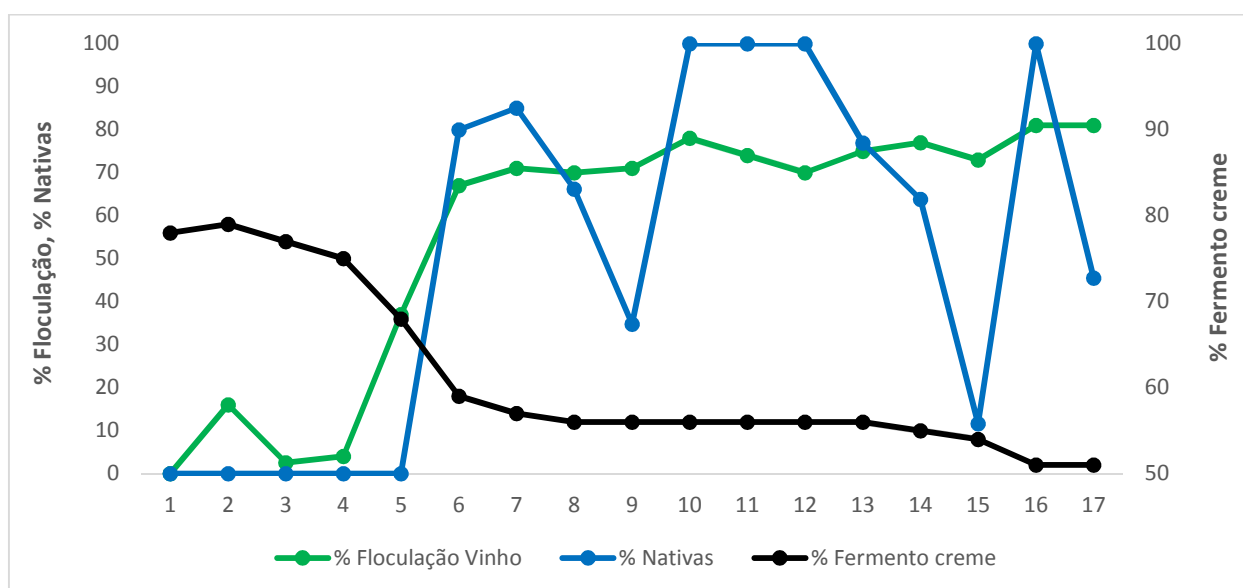


Gráfico 4.7: Perfil de Floculação, concentração de células no creme e participação populacional das leveduras nativas no processo em função das quinzenas de safra 2012

Jin & Speers, citado por Andrietta (2010) constataram que a floculação é um processo controlado geneticamente e cujo mecanismo é muito complexo, o qual é constituído por características genéticas cromossômicas e extra cromossômicas.

Segundo Andrietta (2010), nas últimas safras tem sido relatada uma presença significativa de leveduras floculantes nas dornas de fermentação. Acredita-se que pelo menos 15% das unidades trabalhem com pelo menos uma linhagem floculante em porcentagem significativa no processo.

Apesar das características não desejadas, as leveduras nativas nem sempre são prejudiciais ao processo e por serem bem adaptadas às condições de estresse da indústria acabam se adequando as condições e são responsáveis pelo alto rendimento fermentativo após seu surgimento.

4.1.2.3 Capacidade Fermentativa

As cinco leveduras nativas foram submetidas à avaliação de desempenho, segundo a metodologia de Capacidade Fermentativa (Andrietta et al., 1999).

A tabela 4.9 mostra os parâmetros médios já ajustados Y_p/s , Y_x/s , Produtividade, Conversão, velocidade de consumo do substrato de cada cepa e classificação numérica conforme Capacidade Fermentativa.

Tabela 4.9: Valores médios dos parâmetros de caracterização tecnológica da safra 2012 e classificação numérica utilizando Método de Capacidade Fermentativa

Cepa	01-2012	02-2012	03-2012	04-2012	05-2012	REF
Y _{x/s}	0,0514	0,0392	0,0752	0,0369	0,0431	0,0400
VCS	6,42	6,43	6,22	7,44	5,77	5,80
NCO	98,77	98,87	96,27	100,00	90,18	90,00
Prod	2,73	2,88	2,66	3,19	2,46	2,50
Y _{p/s}	0,4547	0,4784	0,4576	0,4579	0,4550	0,4600
Capacidade Fermentativa	1-1-1-1-1	3-1-1-1-1	1-1-2-1-1	3-1-1-1-1	2-1-2-1-1	1-1-1-1-1

Y_{x/s} = g massa celular seca produzida / g ART consumido

Vcs = g ART consumido / Volume do meio em L x tempo em horas

NCO = % nível de conversão de substrato ART

Prod Esp = g de Etanol produzido / Volume do meio em L x tempo em horas

Y_{p/s} = g de etanol produzido / g ART consumido

O parâmetro rendimento em células (Y_{x/s}) das cinco linhagens distribuem-se pelos três níveis, sendo 40% alto (cepas 1 e 3), 40% baixo (cepas 2 e 4) e 20% médio (cepa 5).

Como citado anteriormente por Andrietta et al. (2011b), em teoria, a levedura que produz maior quantidade de massa celular (Y_{x/s}) tem maior chance de dominar o processo de fermentação. Isso é confirmado quando se observa o comportamento da linhagem Nativa 03 que apresenta o maior valor de Y_{x/s} e foi capaz de substituir a PE-2.

O NCO classifica 60% dos isolados (cepas 01, 02 e 04) como nível alto e 40% (cepas 03 e 05) como nível médio. A linhagem Nativa 04 foi a que apresentou o maior valor para este parâmetro, pois foi a única que consumiu todo o ART disponível no meio indicando que esta cepa apresenta uma alta velocidade de conversão de substrato que no

processo industrial levaria a uma fermentação mais rápida, aumentando a produtividade do processo.

As cepas 02 e 04 são consideradas como único grupo, pois apresentam características tecnológicas iguais. Em relação ao processo da Unidade Catanduva, que não possui secagem de leveduras, são as linhagens mais adequadas, pois tem baixa produção de células, alta conversão, alta produtividade e alto rendimento em etanol o que a torna ideal para uso industrial.

Os demais grupos (01, 03 e 05) apresentaram bons resultados de rendimento em etanol e produtividade, porém possuem alto rendimento em células que pode acarretar problemas operacionais devido à dificuldade de eliminar o excesso de massa celular, já que esta planta não possui unidade de secagem para produção de levedura seca.

Em relação aos parâmetros Y_p/s , PROD e VCS, todos os isolados foram classificados com nível alto, o que é excelente para o processo fermentativo, pois são ótimas produtoras de etanol.

A Tabela 4.10 mostra os dados de rendimento fermentativo industrial da Usina Virgolino de Oliveira – Unidade Catanduva cuja determinação é realizada por balanço de massa descrito Biocontal (2011) e a participação populacional da linhagem de levedura NATIVA 2 a qual apresenta o maior valor de rendimento em etanol (Y_p/s) das linhagens detectadas neste processo na safra 2012.

Tabela 4.10 – Rendimento Fermentativo Industrial e participação populacional da Nativa 2 em relação as quinzenas da safra 2012

Safra 2012	Período	População Nativa 2	RF real
Quinzena 01	09/04-26/04		84,29
Quinzena 02	26/04-10/05		83,84
Quinzena 03	10/05-05/06		86,74
Quinzena 04	05/06-18/06		93,30
Quinzena 05	18/06-02/07		87,24
Quinzena 06	02/07-16/07	26,7	88,17
Quinzena 07	16/07-02/08	35,0	84,20
Quinzena 08	02/08-20/08	66,2	88,16
Quinzena 09	20/08-03/09		87,23
Quinzena 10	03/09-16/09		88,28
Quinzena 11	16/09-04/10		87,34
Quinzena 12	04/10-15/10	41,7	88,13
Quinzena 13	15/10-01/11	23,1	88,12
Quinzena 14	01/11-26/11	2,8	85,97
Quinzena 15	26/11-03/12		84,23
Quinzena 16	03/12-19/12	69,2	83,52
Quinzena 17	19/12-31/12		104,92

Os resultados contidos na tabela 4.10 mostram que nas quinzenas 08, 12 e 16, onde a linhagem Nativa 02 estava presente com alta participação populacional, os valores de rendimento industriais variaram significativamente sem mostrar uma tendência clara, tornando impossível afirmar que a presença desta linhagem contribuiu positivamente no desempenho deste processo. Este fato mostra que quando as linhagens de levedura em processo possuem características fermentativas muito próximas entre si, a participação populacional das mesmas em processo não é capaz de afetar o valor do rendimento fermentativo industrial, já que o mesmo é afetado mais intensamente por outras variáveis,

tais como: qualidade da matéria prima, instabilidade operacional e outros ou a combinação delas. O efeito somente seria significativo no caso de presença de linhagens de levedura com características fermentativas insatisfatórias.

4.2 SAFRA 2013

4.2.1 Etapa 1 - Avaliação da qualidade dos meios de cultivo industriais

4.2.1.1 Caracterização da Matéria-prima

A Tabela 4.11 mostra os valores de concentração de ART, °Brix e Acidez dos mostos industriais de cada quinzena avaliada da safra 2013, assim como as relações Acidez/Brix e ART/ Brix.

Tabela 4.11 - Dados analíticos dos mostos industriais das quinzenas avaliadas safra 2013

SAFRA 2013	° Brix (%p/p)	ART (%p/v)	Acidez (g/L)	Relação ART/BRIX	Relação Acidez/BRIX
Q1 05 – 15/04/13	14,10	13,17	0,60	93,40	4,25
Q2 16 – 30/04/13	20,10	19,16	0,63	95,32	3,11
Q3 01 – 15/05/13	22,53	21,52	1,16	95,52	5,15
Q4 16 – 31/05/13	22,67	22,40	1,20	98,81	5,29
Q5 01 – 15/06/13	20,96	19,82	1,00	94,56	4,77
Q6 16 – 30/06/13	20,89	19,82	0,96	94,88	4,60
Q7 01 – 15/07/13	19,00	17,48	0,90	92,00	4,74
Q8 16 – 31/07/13	20,96	19,59	1,19	93,46	5,68
Q9 01 – 15/08/13	20,42	19,33	1,39	94,66	6,81
Q10 16 – 31/08/13	18,97	17,43	1,30	91,88	6,85
Q11 01 – 15/09/13	21,13	18,89	1,48	89,40	7,00
Q12 16 – 30/09/13	20,57	18,75	1,46	91,15	7,10
Q13 01 – 15/10/13	20,25	18,32	1,29	90,47	6,37
Q14 16 – 31/10/13	20,91	18,52	1,39	88,57	6,65
Q15 01 – 15/11/13	20,02	17,20	1,59	85,91	7,94
Q16 16 – 30/11/13	19,28	15,61	1,11	80,96	5,76

Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme observado nos dados da safra 2012, tabela 4.1, também existiu uma variação significativa na composição dos mostos coletados nas quinzenas avaliadas da safra 2013.

Comparando-se as duas safras no gráfico 4.8 em relação a concentração de ART no mosto nota-se que houve uma variação não somente durante a safra, mas também entre as safras. Mesmo as safras 2012 e 2013 apresentando o mesmo perfil de mix de produção (45% para açúcar) e composição do mosto (30% via mel), observou-se uma variação na concentração de ART no mosto entre as quinzenas das duas safras como mostra o Gráfico 4.8, provavelmente em função da qualidade da cana-de-açúcar.

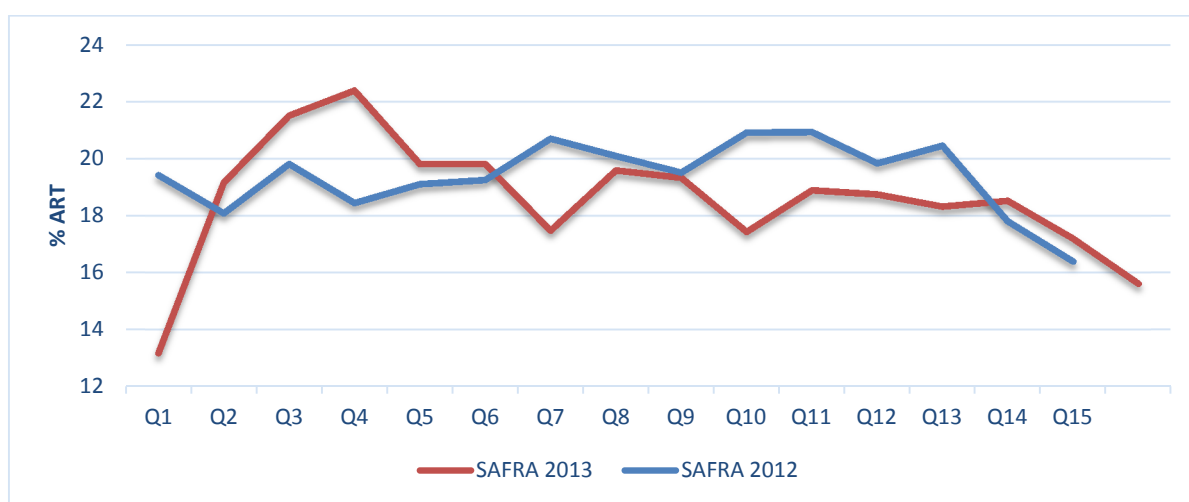


Gráfico 4.8: Comparação entre os valores de concentração de ART das safras 2012 e 2013

Observa-se pela tabela 4.11 que os valores de Acidez/Brix dos meios industriais da safra 2013 estão mais elevados que os da safra 2012. Os valores permaneceram acima de 6,5, nível regular pela classificação da tabela 4.2, em 44% das quinzenas avaliadas, período compreendido de 01/08 a 15/11/13. Porém, de acordo com Andrietta (2010), os valores apresentados na tabela 4.2 são apenas indicativos e não implica que as condições de processo acima destes valores possam acarretar problemas de fermentação ou vice-versa, pois os ácidos são apenas alguns dos produtos formados nas reações secundárias que ocorrem na produção de açúcar. Outros constituintes do

melaço advindos da fabricação de açúcar são prejudiciais as leveduras acima de certos limites.

De acordo com Andrietta (2010), quanto maior for a acidez, espera-se pior desempenho fermentativo da levedura pela forte inibição às células, principalmente pelo ácido acético em pH abaixo de 4,8, e quanto mais baixo a relação ART/Brix maior quantidade de melaço utilizada no preparo do mosto e, portanto, mais substâncias inibidoras estão presentes impactando nas células de levedura e afetando negativamente o desempenho fermentativo.

Tosetto (2002) verificou em seu estudo haver diferenças significativas tanto de comportamento cinético da cepa padrão quanto nos valores dos rendimentos obtidos para os méis testados com diferentes níveis de esgotamento provenientes de diversas unidades produtoras. Mutton & Mutton, citado por Ravanelli (2010), ressaltam a importância do estudo do comportamento da microbiota fermentativa frente ao mosto proveniente de cana danificada, uma vez que a eficiência do processo fermentativo pode ser diretamente influenciada pelos componentes do caldo.

Os gráficos 4.9 e 4.10 mostram respectivamente a correlação entre o rendimento fermentativo experimental e a relação ART/Brix e Acidez/ Brix para os dados contidos na (Tabela 4.11).

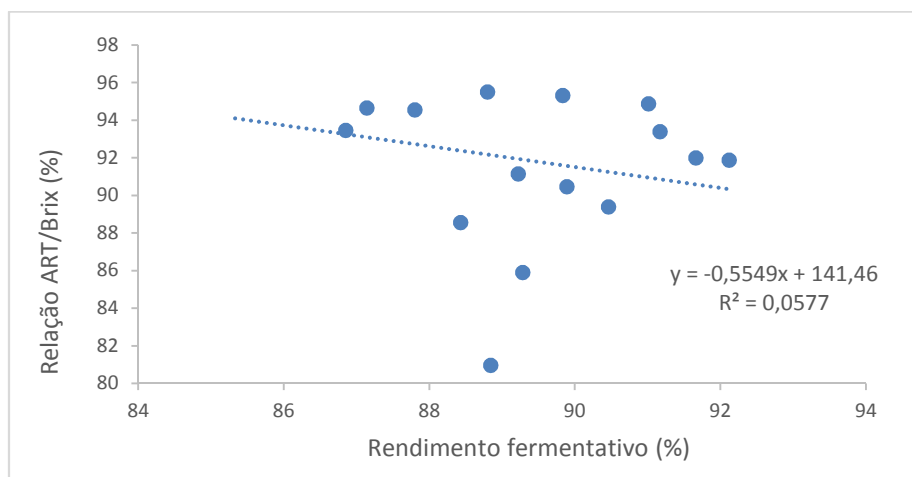


Gráfico 4.9 - Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação ART/Brix

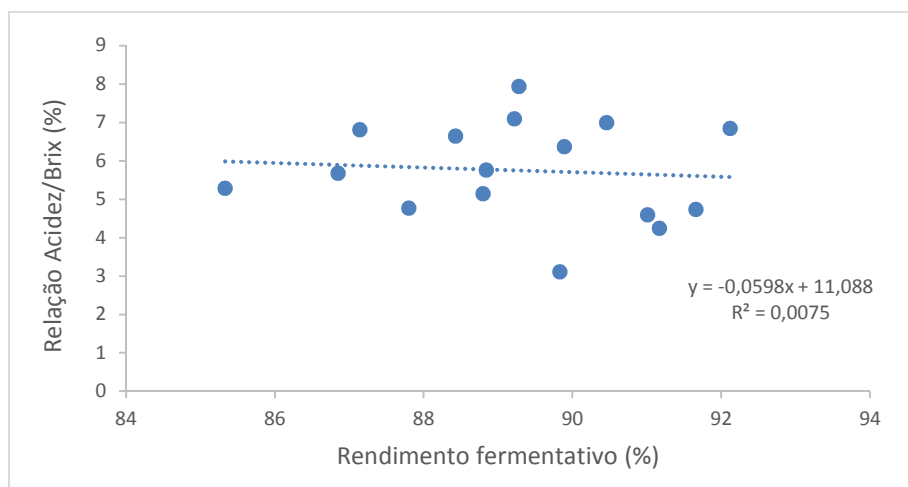


Gráfico 4.10 - Correlação entre o rendimento fermentativo e a relação Acidez/Brix

Igualmente observado para a safra 2012, não foi possível estabelecer uma correlação entre a variação do valor de rendimento fermentativo e as relações ART/Brix e Acidez/Brix. Portanto, este fato comprova que existem outras variáveis que não estão sendo consideradas neste estudo e que interferem significativamente no rendimento fermentativo.

A correlação entre os valores do ART experimental e o ART dos dados industriais é apresentada no gráfico 4.11.

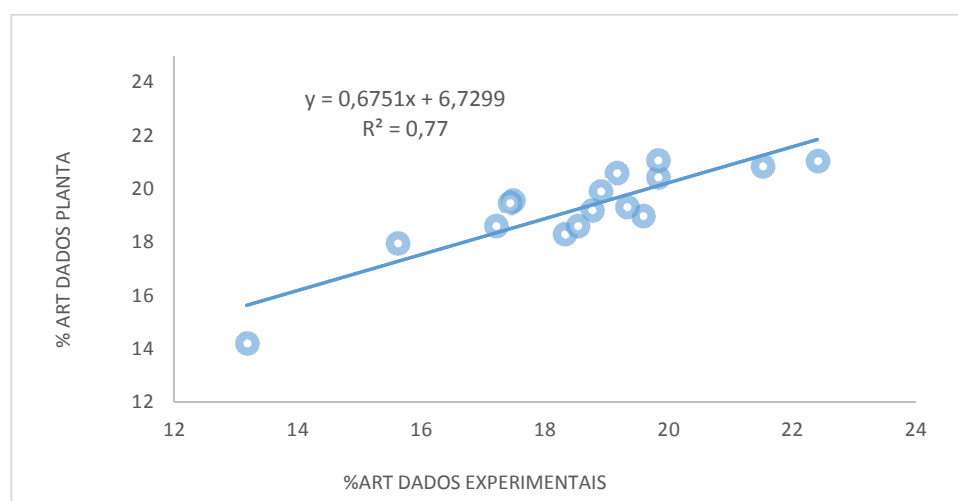


Gráfico 4.11 - Correlação entre a %ART experimental e Industrial da safra 2013

A correlação entre os valores de concentração de ART do mosto experimental e industrial da safra 2013 foi pior que aquela observada nos dados da safra 2012. Não foi possível identificar a causa deste desvio, o qual pode estar associado tanto à possíveis falhas na coleta da composição das amostras para os ensaios ou erros na determinação analítica apresentados pelos dados da planta industrial.

Porém, como o estudo da Etapa 01 tem o objetivo de verificar a performance da Cepa padrão frente às variações da qualidade da matéria prima (mosto), essa distorção da safra 2013 em relação aos dados industriais não é relevante para a análise, pois a comparação ocorre entre as quinzenas testadas e não em relação aos dados da planta industrial.

4.2.1.2 Rendimentos Fermentativos

Na tabela 4.12 são apresentados os resultados do Rendimento Fermentativo Experimental dos meios industriais de cada quinzena da safra 2013, corrigidos pelos valores de referência

Tabela 4.12 - Rendimento Fermentativo Experimental corrigido da Safra 2013

SAFRA 2013			Ensaio Quinzena - Dados corrigidos				
Quinzena	Período	Fator correção	RF_exp Tri 1	RF_exp Tri 2	RF_exp Tri 3	RFc_EXP %	Desvio Padrão
Q1	05-15/04/13	0,9533	91,35	90,98	91,16	91,17	0,18
Q2	16-30/04/13	0,9533	89,76	89,89	89,83	89,83	0,06
Q3	01-15/05/13	0,9708	88,88	88,48	89,05	88,80	0,29
Q4	16-31/05/13	0,9708	85,31	85,66	85,03	85,33	0,32
Q5	01-15/06/13	1,0000	87,67	87,94	87,80	87,80	0,14
Q6	16-30/06/13	1,0000	91,01	90,72	91,31	91,01	0,29
Q7	01-15/07/13	1,0381	91,51	92,03	91,45	91,66	0,32
Q8	16-31/07/13	0,9567	86,89	87,07	86,60	86,85	0,24
Q9	01-15/08/13	1,0226	86,92	87,07	87,42	87,14	0,26
Q10	16-31/08/13	1,0226	92,34	92,28	91,74	92,12	0,33
Q11	01-15/09/13	1,0058	90,32	90,90	90,14	90,46	0,40
Q12	16-30/09/13	1,0058	89,61	89,03	89,01	89,22	0,34
Q13	01-15/10/13	0,9392	89,95	89,81	89,89	89,89	0,07
Q14	16-31/10/13	0,9392	87,78	88,49	89,03	88,43	0,62
Q15	01-15/11/13	0,9521	89,14	89,14	89,56	89,28	0,24
Q16	16-30/11/13	0,9521	88,77	88,25	89,49	88,84	0,62
Média						89,24	

Fonte: Elaborada pelo autor

Observa-se pelos dados contidos na Tabela 4.12 que o rendimento fermentativo oscilou significativamente para cada quinzena de mosto testado, demonstrando a variação da qualidade da matéria-prima ao longo da safra da mesma forma que em 2012. No entanto, não se observa uma correlação entre os rendimentos fermentativos quinzenais entre as duas safras, evidenciando que não existe um padrão na variação da qualidade da matéria-prima ao longo da safra, mostrando que ele é único para cada safra.

4.2.1.3 Delineamento Estatístico

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de cada quinzena foi realizada utilizando-se o Teste-T, por se tratar de uma comparação de dados relativamente

pequena, ou seja, menor que 30. O Teste-T utilizado foi uni-caudal com nível de significância de 95%. Os resultados estão mostrados na tabela 4.13

Tabela 4.13 - Valores de p para o Test-T uni-caudal com nível de significância de 95% para amostras com variância presumidamente diferentes da safra 2013

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15	Q16
Q1		0,00155	0,00037	0,00003	0,00001	0,17306	0,04900	0,00001	0,00003	0,01025	0,03618	0,00137	0,00148	0,00581	0,00031	0,00827
Q2	0,00155		0,01119	0,00057	0,00013	0,18605	0,00402	0,00058	0,00097	0,00275	0,05431	0,04189	0,17804	0,02972	0,02600	0,05450
Q3	0,00037	0,01119		0,00008	0,00745	0,04416	0,00018	0,00052	0,00096	0,00011	0,00288	0,09387	0,00957	0,21250	0,04966	0,46865
Q4	0,00003	0,00057	0,00008		0,00089	0,00363	0,00001	0,00171	0,00091	0,00001	0,00005	0,00007	0,00051	0,00239	0,00005	0,00166
Q5	0,00001	0,00013	0,00745	0,00089		0,02004	0,00029	0,00381	0,01422	0,00026	0,00192	0,00501	0,00008	0,10878	0,00113	0,04798
Q6	0,17306	0,18605	0,04416	0,00363	0,02004		0,08141	0,00953	0,01094	0,04438	0,48863	0,07320	0,20377	0,02401	0,08188	0,04163
Q7	0,04900	0,00402	0,00018	0,00001	0,00029	0,08141		0,00003	0,00003	0,07913	0,00825	0,00041	0,00408	0,00210	0,00036	0,00305
Q8	0,00001	0,00058	0,00052	0,00171	0,00381	0,00953	0,00003		0,11662	0,00003	0,00029	0,00049	0,00048	0,01751	0,00012	0,01020
Q9	0,00003	0,00097	0,00096	0,00091	0,01422	0,01094	0,00003	0,11662		0,00003	0,00031	0,00071	0,00083	0,02648	0,00024	0,01396
Q10	0,01025	0,00275	0,00011	0,00001	0,00026	0,04438	0,07913	0,00003	0,00003		0,00281	0,00022	0,00275	0,00134	0,00023	0,00187
Q11	0,03618	0,05431	0,00288	0,00005	0,00192	0,48863	0,00825	0,00029	0,00031	0,00281		0,00778	0,06353	0,00671	0,00910	0,01286
Q12	0,00137	0,04189	0,09387	0,00007	0,00501	0,07320	0,00041	0,00049	0,00071	0,00022	0,00778		0,03496	0,07500	0,40249	0,21092
Q13	0,00148	0,17804	0,00957	0,00051	0,00008	0,20377	0,00408	0,00048	0,00083	0,00275	0,06353	0,03496		0,02741	0,02046	0,04929
Q14	0,00581	0,02972	0,21250	0,00239	0,10878	0,02401	0,00210	0,01751	0,02648	0,00134	0,00671	0,07500	0,02741		0,06527	0,23590
Q15	0,00031	0,02600	0,04966	0,00005	0,00113	0,08188	0,00036	0,00012	0,00024	0,00023	0,00910	0,40249	0,02046	0,06527		0,17336
Q16	0,00827	0,05450	0,46865	0,00166	0,04798	0,04163	0,00305	0,01020	0,01396	0,00187	0,01286	0,21092	0,04929	0,23590	0,17336	

Os valores destacados em negrito itálico na Tabela 4.13 são aqueles onde o valor de p é maior que 0,025 permitindo que se aceita a hipótese H_0 , confirmando que as médias entre as duas quinzenas comparadas são estatisticamente iguais. Nota-se, que na safra 2013, há um número maior de quinzenas iguais do que em 2012, onde cada quinzena era estatisticamente igual a no máximo outras 4, enquanto que nesta safra, a similaridade entre as quinzenas é muito maior, variando de 3 a 10 quinzenas iguais.

A sexta quinzena, período de 16 a 30/06/13, com rendimento de 90,47%, pode ser considerada igual a outras 10 quinzenas, ou seja, a 62,5% dos dados.

A quarta quinzena, período de 16 a 31/05/13, é a única que não se assemelha com as demais, e apresenta o menor rendimento fermentativo, 85,33%, o que indica ser o período de pior qualidade de matéria-prima. Em contrapartida, a quinzena de maior rendimento é a 10ª, com 92,12% no período de 16 a 31/08/13 e é estatisticamente similar a outras 2 quinzenas.

A tabela 4.14 apresenta a faixa de classificação da qualidade da matéria-prima em função do valor de Rendimento Fermentativo desta safra.

Tabela 4.14 – Classificação da qualidade da matéria-prima em função dos valores de rendimentos fermentativos experimentais da safra 2013

Faixa	Classificação	Grupo de quinzenas	Percentual
Abaixo de 88	Baixo	4, 5, 8 e 9	25,0
88 a 90	Regular	2, 3, 12, 13, 14, 15 e 16	43,7
Acima de 90	Excelente	1, 6, 7, 10 e 11	31,3

São 5 as quinzenas (1, 6, 7, 10 e 11) classificadas como excelente por apresentarem rendimento fermentativo superior ao padrão de referência 90%. Aproximadamente 70% da safra está classificada com rendimento fermentativo entre baixo e regular, o que caracteriza piora da qualidade da matéria-prima, inclusive em relação a 2012, o qual tinha 60% das quinzenas avaliadas entre regular e baixo. As quinzenas 04, 05, 08 e 09 estão classificadas como períodos de baixo rendimento fermentativo, principalmente de 16 a 31/05/13. A maior parte dos ensaios, aproximadamente 44%, se encontra na faixa de regular. Observa-se que, a partir de 16/09 até o fim da safra, há pouca variação na qualidade da matéria-prima capaz de influenciar o rendimento fermentativo.

A tabela 4.15 apresenta os dados reais de Rendimento Fermentativo da Usina Catanduva no período estudado.

Tabela 4.15 - Rendimento Fermentativo Industrial (RFI) da safra 2013

Quinzenas	Período	% RFI
Q1	05-15/04/13	79,21
Q2	16-30/04/13	88,61
Q3	01-15/05/13	87,99
Q4	16-31/05/13	89,50
Q5	01-15/06/13	87,79
Q6	16-30/06/13	89,64
Q7	01-15/07/13	90,21
Q8	16-31/07/13	90,88
Q9	01-15/08/13	92,18
Q10	16-31/08/13	90,81
Q11	01-15/09/13	90,43
Q12	16-30/09/13	90,40
Q13	01-15/10/13	91,28
Q14	16-31/10/13	92,02
Q15	01-15/11/13	89,49
Q16	16-30/11/13	86,58
	Média	89,19

Embora a média aritmética dos dados de Rendimento Fermentativo Industrial e do Rendimento Fermentativo Experimental da safra de 2013 apresentarem valores muito próximos, 89,19% e 89,24% respectivamente, não se observou, assim como em 2012, uma boa correlação entre esses dados nas quinzenas analisadas conforme mostra o gráfico 4.12.

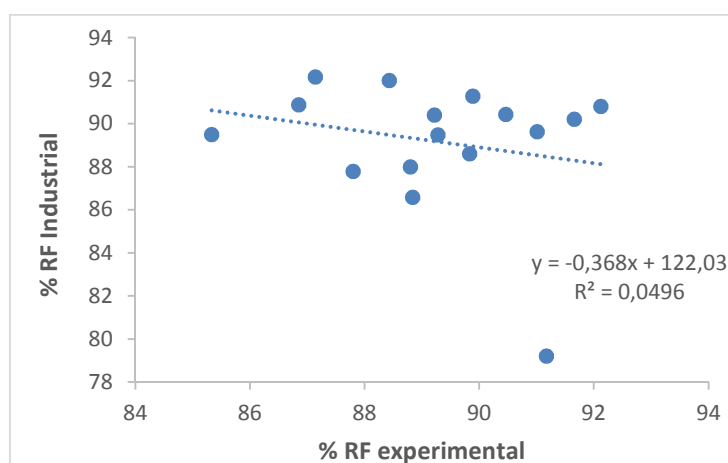


Gráfico 4.12 – Comparativo entre Rendimentos Experimentais e Industriais da safra 2013

A não existência de correlação entre os valores de rendimento experimental e industrial mostra que existem outros fatores que interferem significativamente no rendimento fermentativo industrial além da matéria prima.

4.2.2 Etapa 02 - Avaliação de desempenho das linhagens Industriais da safra 2013

4.2.2.1 Dominância e Persistência das Leveduras isoladas

A safra 2013 da Usina Catanduva foi iniciada com 300 kg de leveduras selecionadas, sendo 150 kg PE-2 e 150 kg CAT-1.

Após isolados nas placas de WLN, os biótipos que apresentaram morfologia de colônia diferentes foram isolados e submetidos a análise de cariotipagem. Os testes resultaram no isolamento de 8 linhagens de levedura distintas na safra 2013, em concentração superior a 10^6 UFC/ml, sendo 6 nativas e 2 selecionadas. A Tabela 4.16 apresenta a dinâmica populacional destas linhagens identificadas no processo em cada quinzena e o gráfico 4.13 ilustra essa dinâmica.

Tabela 4.16 - Dinâmica Populacional das Leveduras do Processo na safra 2013

Safra 2013	Data coleta	PE-2	CAT-1	Nativa 1	Nativa 2	Nativa 3	Nativa 4	Nativa 5	Nativa 6
Quinzena 1	02/05/2013	61,6	38,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 2	16/05/2013	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 3	03/06/2013	66,7	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 4	17/06/2013	36,4	0,0	54,6	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 5	05/07/2013	42,8	0,0	0,0	0,0	42,8	14,4	0,0	0,0
Quinzena 6	16/07/2013	7,2	0,0	42,8	21,4	28,6	0,0	0,0	0,0
Quinzena 7	02/08/2013	29,1	15,8	42,0	13,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Quinzena 8	19/08/2013	0,0	0,0	0,0	26,3	0,0	68,4	5,3	0,0
Quinzena 9	03/09/2013	0,0	21,3	0,0	68,1	0,0	0,0	10,6	0,0
Quinzena 10	16/09/2013	31,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	68,7	0,0
Quinzena 11	30/09/2013	0,0	9,1	0,0	21,3	0,0	0,0	33,3	36,4
Quinzena 12	15/10/2013	0,0	46,9	0,0	0,0	31,3	0,0	21,8	0,0
Quinzena 13	01/11/2013	17,6	0,0	0,0	29,4	35,3	18,8	5,9	0,0
Quinzena 14	08/11/2013	0,0	0,0	0,0	70,6	0,0	0,0	15,7	13,7
Quinzena 15	30/11/2013	43,7	0,0	0,0	25,0	0,0	12,5	18,8	0,0

Fonte: Elaborado pelo autor

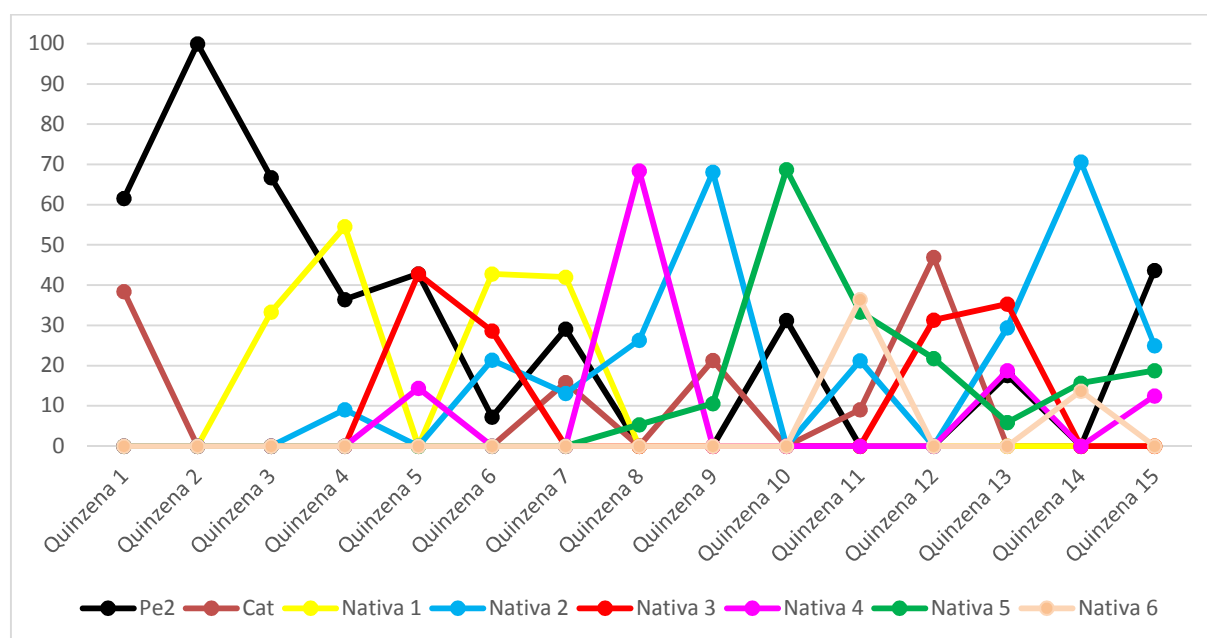


Gráfico 4.13 – Perfil populacional das linhagens ao longo da safra 2013

Assim como observado em 2012, a dinâmica populacional de leveduras sofre uma grande variação durante a safra, tanto pelo aparecimento de novas linhagens ou simplesmente pela presença de outras que já haviam surgido e ora aparecem em maior ou menor porcentagem.

Observa-se que, em 2013, as leveduras nativas apareceram com 32 dias enquanto que na safra 2012 as selecionadas permaneceram 98 dias isoladas.

As duas primeiras quinzenas da safra, são constituídas 100% por leveduras selecionadas, PE-2 e CAT-1. Acredita-se que as condições de processo ou matéria-prima diferente favoreceram a entrada das nativas e a sua permanência.

A linhagem CAT-1, manteve o mesmo comportamento de 2012 e mostrou uma capacidade de adaptação às condições industriais menor do que a PE-2, aparecendo em apenas 33% das coletas. Em 2012 sua presença foi detectada em 41% das coletas. Nesta safra, concentração da linhagem CAT-1 atingiu valores inferior a 10^6 UFC/ml já na segunda coleta, período de 16/05/13, voltando a ser detectada na primeira quinzena de agosto. A PE-2, entretanto, mostrou a mesma dominância e persistência de 2012, porém em menor número, 67% em 2013 contra 76% das quinzenas estudadas em 2012.

Antonangelo (2012) constatou em seu estudo na Usina São Manoel que, apesar da fermentação ter sido iniciada com leveduras 100% selecionadas (50% PE-2 e 50% CAT-1), foi registrado o aparecimento de leveduras nativas trinta dias após o início de safra, bem como a diminuição da população de PE-2 e CAT-1.

Como já explicado, o fato de algumas linhagens aparecerem em uma quinzena, não serem detectadas em outras e voltarem a aparecer em quinzenas subsequentes está vinculado a limitação do método de isolamento dos biótipos no plaqueamento das amostras que somente permite a detecção de linhagens acima da concentração de 10^6 UFC/ml. A não detecção de certas linhagens em algumas quinzenas não significa que a mesma foi eliminada do processo, pois, ela pode estar em concentrações inferiores a 10^6 UFC/ml.

Apesar da identificação de 8 cepas no processo, 6 nativas e 2 selecionadas, na maioria das quinzenas, a população é constituída de 3 a 4 linhagens de leveduras, maior variedade do que observado em 2012. A segunda coleta é constituída por um único isolado, PE-2 e na 13ª coleta foram detectadas 5 linhagens de levedura, fato não

observado em 2012. As leveduras selecionadas na safra 2013 mostraram-se mais bem adaptadas ao meio, pois em apenas duas coletas (de 19/08/13 e 08/11/13) não se detectou nenhuma levedura selecionada, enquanto que em 2012, não foram detectadas em 4 coletas com dominância de leveduras nativas.

As Nativas 1, 3 e 4 foram detectadas em 27% das coletas. A Nativa 1 é uma linhagem com muita dominância, porém pouca persistência. Das 4 coletas em que apareceu, dominou com população acima de 40% em 75% dos casos. A coleta em que ela aparece com menor participação (33%) foi dominada pela PE-2 com 67% da população. A Nativa 3 é uma linhagem com participação populacional entre 28 e 43% e a Nativa 4 com população abaixo de 20% em 3 coletas. A coleta correspondente a segunda quinzena de agosto detecta a Nativa 04 como linhagem dominante (68%).

As Nativas 2 e 5 são linhagens persistentes e menos dominantes, pois foram detectadas, respectivamente, em 60% e 53% das quinzenas, porém com modesta participação populacional na maior parte das coletas. A Nativa 5 foi detectada na primeira quinzena de setembro e persistiu até o fim da safra, com participação populacional na maior parte das coletas abaixo de 35%. Essas foram cepas que apresentaram a capacidade de se instalar e permanecer por um tempo maior no processo entre as nativas, assim como ocorreu com a Nativa 03 em 2012.

A Nativa 6 foi a linhagem com menor participação populacional, detectada em 13% das coletas.

O ambiente de fermentação é complexo, principalmente em processos que utilizam o caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima. Nesse sistema, ocorre uma sucessão intensiva de linhagens de *S. cerevisiae* no mosto de fermentação. No processo fermentativo, quando o fermento original é substituído por linhagens selvagens, as cepas selvagens podem se tornar mais adaptadas ao processo fermentativo. Em alguns casos, o fermento original é completamente substituído por linhagens selvagens *S. cerevisiae* (SILVA-FILHO, 2003).

Hirasawa, citado por Silva (2012) descreve que o desempenho bem-sucedido das fermentações alcoólicas depende da capacidade das linhagens de leveduras utilizadas em lidar com um número de fatores de estresse que ocorre durante o processo.

Muitos autores estudaram a introdução espontânea de linhagens nativas nos processos, Andrietta et al. (2011b) também observaram substituição da população de leveduras no processo fermentativo ao monitorarem a safra de uma usina sucroalcooleira através de cariotipagem. Antonangelo (2012) avaliou que não foram observados problemas referentes à produtividade de álcool devido à predominância de cepas de leveduras autóctones no processo da Usina São Manoel, pelo menos no que se refere à safra de 2008.

4.2.2.2 Flocculação

A tabela 4.17 apresenta os resultados das flocculações das linhagens observadas durante os experimentos.

Tabela 4.17 - Classificação de flocculação das leveduras nativas da safra 2013

Padrão CAT-1	01-2013	02-2013	03-2013	04-2013	05-2013	06-2013
Ausente	Média	Pesada	Média	Leve	Pesada	Leve

Com base nos dados contidos na Tabela 4.17, conclui-se que todas as leveduras nativas identificadas no processo de fermentação da safra de 2013 são naturalmente flocculantes, assim como ocorreu em 2012.

Em comparação com os dados reais da planta industrial, a entrada das linhagens de leveduras flocculantes é percebida através de variáveis de controle da operação: diminuição da % de fermento do creme de levedura nas separadoras centrífugas e aumento da % de flocculação do vinho levedurado, ambas detectados por análise físico-química e microbiológica. O gráfico 4.14 apresenta esses dados.

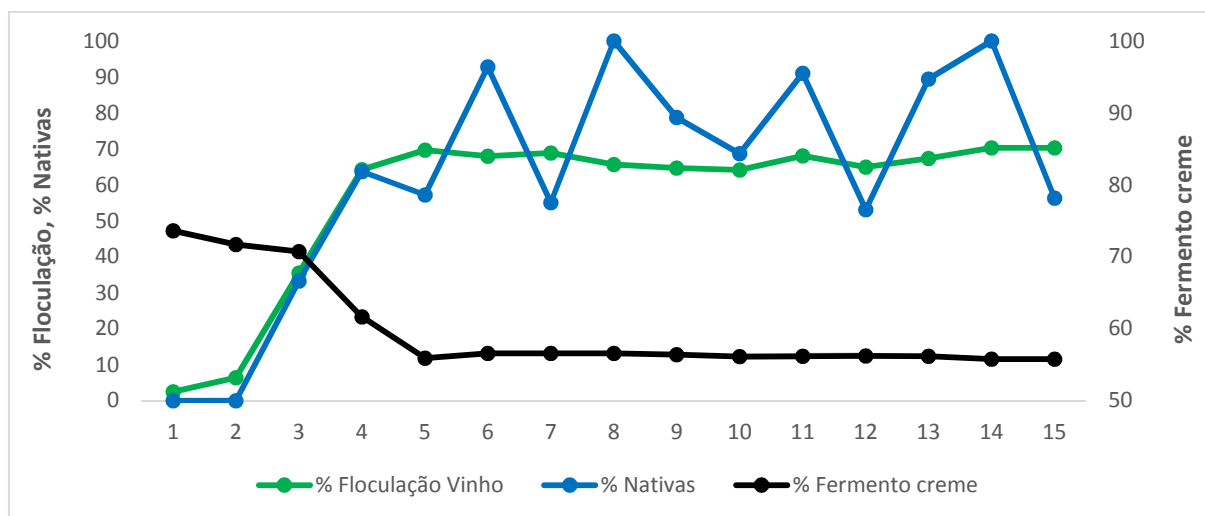


Gráfico 4.14 - Perfil de Floculação, concentração de células no creme e participação populacional das leveduras nativas no processo em função das quinzenas de safra 2013

Observa-se, no gráfico 4.14, que após a quinzena 3, há aumento significativo da floculação e redução na concentração de fermento no creme de levedura. Esse período corresponde a terceira coleta, onde foi observado a entrada das leveduras nativas, mais especificamente a Nativa 1, observada nos experimentos com floculação média. Assim como ocorreu na safra 2012, a floculação das células de levedura no processo industrial persistiu até o fim da safra, bem como a presença das nativas.

Até bem pouco tempo, acreditava-se que a floculação ocorria mais frequentemente na presença de algum tipo de bactéria na dorna. Hoje são conhecidas algumas linhagens de levedura do gênero *Saccharomyces* que apresentam propriedades de floculação. Estas linhagens possuem, em sua composição genômica, genes que expressam proteínas conhecidas como floculinas que permitem que essas leveduras cresçam de forma floculada (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

Como já observado nos resultados da safra 2012, a entrada de leveduras nativas e floculantes no processo da Usina Catanduva é recorrente. Antigamente a substituição do fermento floculado no processo industrial durante a safra parecia ser a solução do problema, até se perceber que na verdade somente agrava o problema, uma vez que a troca implica em parada de produção, desvio de açúcar para multiplicar a nova cepa e a incerteza da adaptação das novas linhagens. Sendo assim, adaptar-se ao processo

floculado realizando ajustes operacionais até obter um bom rendimento com as nativas floculantes parece ser a melhor solução até o momento para lidar com a entrada de linhagens de leveduras floculantes.

Antonangelo (2012), ao analisar a genotipagem de leveduras presentes no processo de etanol da Usina São Manoel, concluiu que embora, atualmente, muitas indústrias utilizem cepas selecionadas de *S. cerevisiae* como iniciadoras, a condição não estéril dos substratos torna este processo sujeito a constantes contaminações por bactérias e linhagens de leveduras nativas de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras nativas dominam rapidamente a população iniciadora do processo por serem cepas genética e fisiologicamente adaptadas às condições daquele ambiente. Tais leveduras podem prejudicar o processo fermentativo, porém, algumas entre elas, podem apresentar características positivas.

4.2.2.3 Capacidade Fermentativa

As seis leveduras nativas foram submetidas à avaliação de desempenho, segundo a metodologia de Capacidade Fermentativa (ANDRIETTA et al., 1999).

A tabela 4.18 mostra os parâmetros médios já ajustados Y_p/s , Y_x/s , Produtividade, Conversão, velocidade de consumo do substrato de cada cepa e classificação numérica conforme Capacidade Fermentativa.

Tabela 4.18 - Valores médios dos parâmetros de caracterização tecnológica da safra 2013 e classificação numérica utilizando Método de Capacidade Fermentativa.

Cepa	01-2013	02-2013	03-2013	04-2013	05-2013	06-2013	REF
Yx/s	0,0382	0,0432	0,0545	0,0299	0,0217	0,0406	0,0400
VCS	5,63	5,76	5,78	6,80	6,47	5,71	5,80
NCO	88,18	90,24	90,24	100,00	99,96	89,10	90,00
Prod	2,51	2,49	2,50	2,94	2,85	2,46	2,50
Yp/s	0,4750	0,4609	0,4608	0,4615	0,4700	0,4607	0,4600
Capacidade Fermentativa	3-2-3-1-1	2-1-2-1-1	1-1-2-1-1	3-1-1-1-1	3-1-1-1-1	2-1-3-1-1	1-1-1-1-1

O parâmetro rendimento em células ($Y_{x/s}$) das seis linhagens, também observado em 2012, distribuem-se pelos três níveis, sendo 17% alto (cepa 3), 50% baixo (cepas 1, 4 e 5) e 33% médio (cepas 2 e 6).

Como já citado anteriormente na análise da safra 2012, item 4.1.2.3, a levedura que produz maior quantidade de massa celular ($Y_{x/s}$) tem maior chance de dominar o processo de fermentação. A linhagem Nativa 3 foi a que apresentou maior valor de $Y_{x/s}$ e se mostrou dominante sempre que foi detectada nas coletas. Porém não repetiu o comportamento de persistência da Nativa 3 da safra 2012, onde o maior valor de $Y_{x/s}$ foi obtido na cepa que mais permaneceu no processo. Este tipo de linhagem não é indicado para Plantas industriais que não possuem Unidade de Secagem para produção de levedura seca, pois por possuir alto rendimento em células pode acarretar problemas operacionais devido à dificuldade de eliminar o excesso de massa celular.

Quando comparamos o comportamento das linhagens nativas 02 e 06 de comportamento médio de $Y_{x/s}$ notamos que as mesmas apresentaram perfil de participação populacional distintos. A linhagem 2 mostra uma maior dominância quando comparado com a linhagem Nativa 6. Este fato mostra que o valor de $Y_{x/s}$ de uma linhagem é um fator que favorece a permanência da linhagem, mas não garante a dominância. O mesmo pode-se afirmar para as linhagens nativas 01, 04 e 05, que apesar

de apresentarem baixo rendimento em células fizeram-se presentes no processo em concentração superior a 10^6 UFC/mL em várias coletas.

O NCO classifica igualmente os isolados como nível alto (Cepas 04 e 05), nível médio (cepas 02 e 03) e nível baixo (Cepas 01 e 06). A linhagem Nativa 04, assim como observado em 2012, foi a que apresentou o maior valor para este parâmetro, pois foi a única que consumiu todo o ART disponível no meio indicando que esta cepa apresenta uma alta velocidade de conversão de substrato que no processo industrial levaria a uma fermentação mais rápida, aumentando a produtividade do processo. A Nativa 05 também se mostra muito veloz na conversão do substrato.

As cepas 04 e 05 são consideradas como único grupo, pois apresentam características tecnológicas iguais. Em relação ao processo da Unidade Catanduva, que não possui secagem de leveduras, são as linhagens mais adequadas, pois tem baixa produção de células, alta conversão, alta produtividade e alto rendimento em etanol o que a torna ideal para uso industrial.

As cepas 01, 02, 03 e 06 são considerados grupos diferentes entre si. Portanto, segundo a classificação pela capacidade fermentativa, as linhagens podem ser classificadas em 5 grupos.

Em relação aos parâmetros Y_p/s e PROD, todos os isolados foram classificados com nível alto, o que é excelente para o processo fermentativo, pois são ótimas produtoras de etanol e com excelente produtividade, fato também observado em 2012.

A Tabela 4.19 mostra os dados de rendimento fermentativo industrial da Usina Virgolino de Oliveira – Unidade Catanduva cuja determinação é realizada por balanço de massa conforme descrito por Biocontal (2011) e a participação populacional das linhagens de levedura NATIVA 1 e 5, a qual apresentaram os maiores valores de rendimento em etanol (Y_p/s) das linhagens detectadas neste processo na safra 2013.

Tabela 4.19 - Rendimento Fermentativo Industrial e participação populacional das Nativas 01 e 05 em relação as quinzenas de safra 2013.

Safra 2013	Periodo	População Nativa 1	População Nativa 5	RF real
Quinzena 01	02/04 - 02/05	0	0	87,02
Quinzena 02	03/05 - 16/05	0	0	87,67
Quinzena 03	17/05 - 03/06	33	0	88,32
Quinzena 04	04/06 - 17/06	55	0	89,31
Quinzena 05	18/06 - 05/07	0	0	90,31
Quinzena 06	06/07 - 16/07	43	0	90,50
Quinzena 07	17/07 - 02/08	42	0	91,08
Quinzena 08	03/08 - 19/08	0	5	91,98
Quinzena 09	20/08 - 03/09	0	11	90,25
Quinzena 10	04/09 - 16/09	0	69	90,13
Quinzena 11	17/09 - 30/09	0	33	89,71
Quinzena 12	01/10 - 15/10	0	22	90,84
Quinzena 13	16/10 - 01/11	0	6	92,26
Quinzena 14	02/11 - 08/11	0	16	86,25
Quinzena 15	09/11 - 30/11	0	19	87,48

Os resultados contidos na tabela 4.19 mostram que após a quinzena 03, onde as linhagens Nativas de maior rendimento em etanol foram detectadas, o rendimento industrial variou significativamente para cima. Não foi possível, a partir desta quinzena, correlacionar a variação dos rendimentos industriais com as características tecnológicas das linhagens dominantes.

O maior valor de rendimento industrial obtido ocorreu na quinzena 13, onde a Nativa 01 não foi detectada, a Nativa 05 participou com população inferior a 10% e 5 linhagens distintas estavam presentes em concentração superior a 10^6 UFC/ml. Sendo assim, torna-se impossível afirmar que a presença das Nativas 1 e 5 contribuíram positivamente no desempenho deste processo. Conforme discutido na safra 2012, este fato mostra que quando as linhagens de levedura em processo possuem características fermentativas muito próximas entre si, a participação populacional das mesmas em processo não é capaz de afetar significativamente o valor do rendimento fermentativo industrial, já que o mesmo é mais afetado por outras variáveis, tais como: qualidade da

matéria prima, instabilidade operacional e outros. O efeito somente seria significativo no caso de presença de linhagens de levedura com características fermentativas insatisfatórias.

5. CONCLUSÕES

Houve mudança significativa de matéria prima ao longo da safra e entre as safras e a oscilação acontece de forma diferente entre os períodos.

A qualidade da matéria-prima influenciou na performance da linhagem padrão CAT-1, determinada pela variação no Rendimento Fermentativo obtido em escala reduzida.

Apesar da forte influência no desempenho da levedura, a variação de matéria-prima para fermentação não pode ser considerada como único fator de impacto no Rendimento Fermentativo Industrial.

Os dados disponíveis atualmente de qualidade do mosto não são suficientes para se prever possíveis perdas de desempenho do processo de fermentação industrial.

A única forma de se determinar a qualidade fermentativa do mosto industrial são os testes de fermentação de escala reduzida, já que no momento na indústria, não se pode detectar analiticamente a presença de substâncias que possam afetar o rendimento da levedura por falta de equipamentos.

Encontrou-se 11 linhagens de leveduras nativas que possuem características e capacidades fermentativas diferentes entre si nas duas safras estudadas. Foram detectadas 5 cepas em 2012 e 6 em 2013.

Todas as leveduras nativas apresentaram características floculantes, variando entre si na intensidade, de leve a pesada.

As leveduras nativas encontradas nesse estudo são excelentes fermentadoras, pois possuem valores de rendimento em etanol e níveis de conversão elevados.

As diferentes leveduras nativas que apareceram no processo fermentativo se mostraram mais adaptadas ao meio, sendo capazes de competir com as leveduras selecionadas e dominar o processo ao longo da safra.

A oscilação no rendimento fermentativo devido a matéria-prima é maior do que devido a levedura, pois das onze linhagens identificadas pela cariotipagem, pode-se comprovar que em relação a capacidade fermentativa elas podem ser classificadas em apenas dois tipos em cada safra.

Em relação aos coeficientes de rendimento e eficiência da fermentação, os resultados obtidos em escala reduzida com base nos balanços de massa se apresentaram dentro da faixa esperada quando comparados aos valores de referência. Isto sugere que a metodologia usada para avaliar a capacidade fermentativa das cepas e a qualidade da matéria-prima foi adequada.

A mudança de matéria-prima e diferentes linhagens de levedura no processo, apesar da forte influência, não podem ser utilizados isoladamente e como únicos fatores de impacto no Rendimento Fermentativo para acompanhamento e condução do processo.

A precisão dos valores de Rendimento fermentativo obtidos industrialmente é fortemente afetada pela qualidade dos resultados analíticos e pela medição de vazão de mosto. Este fato afeta a análise de desempenho do processo industrial e a comparação dos dados obtidos na fermentação experimental com os valores industriais.

REFERÊNCIAS

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

AMORIM, H. V. A qualidade da matéria-prima sob a óptica do homem da indústria. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, jul./set., 2013. Disponível em: <<http://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/qualidade-da-materia-prima-sob-optica-do-homem-da/>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec Publicações, 2005. v. 3000.

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. S. Bioethanol: what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? **Biofuel production: recent developments and prospects.** M. A. S. Bernardes (Ed). Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/bioethanol-what-has-brazil-learned-about-yeasts-inhabiting-the-ethanol-production-processes-from-sug->>. Acesso em: 26 jan. 2017. 2011a.

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

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA S. R. Bioethanol: Brasil, 30 anos de vanguarda. **MultiCiência: revista interdisciplinar dos centros e núcleos da Unicamp**, Campinas, v. 7, p. 1-16, 2006.

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

ANDRIETTA, S. R. Curso **engenharia da fermentação**. Sertãozinho: Elican Consultoria e Treinamento, 2010.

ANDRIETTA, S. R. Fermentação para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, jul./set., 2013. Disponível em: <<http://revistaonline.revistaopinioes.com.br/revistas/revistas/85/#page/52>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

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

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial**. 1994. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANTONANGELO, A. T. B. F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo de poliformismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

BASSO, L. C. E et al. Dominância das leveduras contaminantes sobre linhagens industriais avaliadas pela técnica da cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5, Águas de São Pedro, p 45-49, 1993.

BASSO, L. C. E et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 8. p 1155-1163, 2008.

BATISTOTE, M. E et al. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias do Mato Grosso do Sul na produção de etanol à base de cana-de-açúcar. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 32 2 p. 83 - 95, 2010.

BIOCONTAL. **Cálculo de rendimento fermentativo por balanço de massa**. Campinas, 2011. Disponível em: <<http://www.biocontal.com.br/informativos/08>>. Acesso em: 5 jan. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Cana-de-Açúcar**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 24 jan. 2017.

CALLEJA, G. B. Cell aggregation. In: ROSE, A. H.; Harrison, J. S. **The yeasts**. 2 ed. London, Academic Press, v. 2, 1987.

COPERSUCAR – **Fermentação**. Centro de Tecnologia Copersucar - Divisão Industrial, CTDI. Piracicaba. 1987.

CORREA, A. L. Fim de um ciclo? **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 47, n. 12, 17 jan. 2016. Disponível em: <<http://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/3-fim-de-um-ciclo/>>. Acesso em: 17 jan. 2016.

DARE, R. M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

DOMINGUES, L. M. A. R. **Estirpes flocculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para utilização da lactose**: construção e aplicação biotecnológica. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2001.

FERMENTEC. **Leveduras com habilidade melhorada que apresentam alta persistência e dominância**. Piracicaba, 2015. Disponível em: <<http://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

FERMENTEC. **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool**. 5. ed. Piracicaba, 2014. Método FTCQ, 05/024.

FERNANDES P. L. Crescimento e investimentos. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 56, ano 10, abr-jun 2013. Disponível em: <<http://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/2-crescimento-e-investimentos/>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

FIGUEIREDO, C. M. **Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil.** 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FINGUERUT, J. Fermentando com eficiência e controle de perdas. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO UDOP, 2007. Araçatuba.

FRANCO, C. T. J. O futuro do etanol no Brasil. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, v. 46, n. 12, out/dez. 2015. Disponível em <<http://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/1-o-futuro-do-etanol-no-brasil/>>. Acesso em: 17 jan. 2016.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e dornas de fermentação alcoólica.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

JIN, Y. A.; SPEERS, R. A. B. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 31, n. 6-7, p. 421-440, 1998.

KAMADA, K.; MURATA, M. On the mechanism of brewer's yeast flocculation. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, n. 10, p. 2423-2433, 1984.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo, Edgard Blucher, v.3, p.1-43, 2001.

MOREIRA, B. L. D. E et al. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1672 – 1677, 2013.

MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. In: Workshop sobre: "Produção de etanol: qualidade de matéria-prima". Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

NAVES, R. F. E et al. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina sucroalcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, 2010.

NOVA CANA. **Sobre o etanol**. 2016. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/sobre-etanol/>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010.

PAYNE, J. H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. São Paulo: Nobel: Stab, 1989.

RAVANELLI, G. C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar**. 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

SILVA, D. F. C. **Análise por técnica de RDA (Representational Difference Analysis) da expressão gênica diferencial, para a identificação de fatores genéticos associados à produção de etanol em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biociência e Biotecnologia aplicadas a farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Araraquara, 2012.

SILVA-FILHO, E. A. **Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização de processo de fermentação**. 2003. 108 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Departamento de Micologia. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

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

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

STROPPIA, C. T. **Dinâmica populacional de leveduras caracterizadas por eletrocariótipos e desempenho fermentativo em processos de fermentação alcoólica.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

TEIXEIRA, J. A. E et al. Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 5, p. 197-203, 1995.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético da levedura.** 2002. 83 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

VASCONCELOS. Processo de produção de etanol de cana-de-açúcar: apostila. [s.l.], [s.n.], [s.d.] Disponível em: <<http://docente.ifrn.edu.br/samueloliveira/disciplinas/tecnologia-de-fabricacao-de-biocombustiveis/bioetanol/apostila-2-processo-de-producao-de-etanol-de-cana-de-acucar/view>>. Acesso em: 14 dez. 2015. A seguinte apostila foi retirada do livro: Cana-de-açúcar – Bioenergia, açúcar e etanol.

WHEALS, A.E. E et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, 17(12), 482-487. 1999.

APÊNDICE A - Resultados dos Ensaio das Leveduras Nativas

Tabela A.1: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 01 (01-2012)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0342	0,0341	0,0340	0,0341	0,852	0,0388	0,0390	0,0535	0,0438	0,0456	0,0458	0,0628	0,0514	0,008
Yp/s	0,4600	0,4702	0,4682	0,4662	0,4682	1,018	0,4612	0,4632	0,4639	0,4628	0,4532	0,4551	0,4558	0,4547	0,001
Prod	2,50	2,27	2,27	2,27	2,27	0,910	2,47	2,47	2,52	2,49	2,71	2,71	2,77	2,73	0,032
VCS	5,80	4,84	4,86	4,87	4,85	0,837	5,35	5,33	5,44	5,37	6,39	6,37	6,50	6,42	0,059
Conv	90,00	78,67	78,74	78,79	78,73	0,875	85,87	85,81	87,55	86,41	98,15	98,09	100,07	98,77	0,986
Prod Esp	0,48	0,57	0,57	0,57	0,57	1,193	0,50	0,50	0,36	0,45	0,41	0,41	0,30	0,38	0,077
VCS esp	1,05	1,22	1,22	1,23	1,22	1,164	1,07	1,07	0,78	0,97	0,92	0,92	0,67	0,84	0,169

Tabela A.2: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 02 (02-2012)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0342	0,0341	0,0340	0,0341	0,852	0,0377	0,0311	0,0313	0,0334	0,0443	0,0365	0,0368	0,0392	0,004
Yp/s	0,4600	0,4702	0,4682	0,4662	0,4682	1,018	0,4936	0,4821	0,4849	0,4869	0,4849	0,4737	0,4764	0,4784	0,006
Prod	2,50	2,27	2,27	2,27	2,27	0,910	2,72	2,57	2,57	2,62	2,99	2,83	2,83	2,88	0,087
VCS	5,80	4,84	4,86	4,87	4,85	0,837	5,52	5,34	5,31	5,39	6,59	6,37	6,34	6,43	0,114
Conv	90,00	78,67	78,74	78,79	78,73	0,875	88,69	85,44	85,36	86,50	101,38	97,66	97,58	98,87	1,900
Prod Esp	0,48	0,57	0,57	0,57	0,57	1,193	0,55	0,65	0,65	0,61	0,46	0,54	0,54	0,51	0,058
VCS esp	1,05	1,22	1,22	1,23	1,22	1,164	1,10	1,34	1,33	1,26	0,95	1,15	1,14	1,08	0,133

Tabela A.3: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 03 (03-2012)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0236	0,0156	0,0309	0,0234	0,585	0,0288	0,0441	0,0590	0,0440	0,0493	0,0754	0,1009	0,0752	0,015
Yp/s	0,4600	0,4731	0,4687	0,4961	0,4793	1,042	0,4739	0,4787	0,4779	0,4768	0,4548	0,4594	0,4587	0,4576	0,003
Prod	2,50	2,49	2,49	2,66	2,55	1,019	2,74	2,71	2,70	2,71	2,69	2,66	2,65	2,66	0,022
VCS	5,80	5,26	5,31	5,36	5,31	0,916	5,78	5,66	5,64	5,69	6,31	6,18	6,16	6,22	0,074
Conv	90,00	82,51	83,56	83,85	83,31	0,926	90,28	88,68	88,39	89,12	97,53	95,80	95,49	96,27	1,020
Prod Esp	0,48	0,83	1,25	0,67	0,92	1,912	0,68	0,45	0,34	0,49	0,36	0,24	0,18	0,26	0,177
VCS esp	1,05	1,76	2,67	1,35	1,93	1,834	1,44	0,94	0,71	1,03	0,79	0,51	0,38	0,56	0,377

Tabela A.4: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 04 (04-2012)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0342	0,0341	0,0340	0,0341	0,852	0,0269	0,0337	0,0337	0,0314	0,0316	0,0395	0,0395	0,0369	0,004
Yp/s	0,4600	0,4702	0,4682	0,4662	0,4682	1,018	0,4612	0,4685	0,4685	0,4661	0,4532	0,4603	0,4603	0,4579	0,004
Prod	2,50	2,27	2,27	2,27	2,27	0,910	2,87	2,91	2,91	2,90	3,16	3,20	3,20	3,19	0,023
VCS	5,80	4,84	4,86	4,87	4,85	0,837	6,23	6,22	6,22	6,22	7,45	7,43	7,43	7,44	0,007
Conv	90,00	78,67	78,74	78,79	78,73	0,875	99,60	99,40	99,40	99,46	113,85	113,62	113,62	113,69	0,116
Prod Esp	0,48	0,57	0,57	0,57	0,57	1,193	0,71	0,58	0,58	0,62	0,60	0,49	0,49	0,52	0,078
VCS esp	1,05	1,22	1,22	1,23	1,22	1,164	1,55	1,24	1,24	1,34	1,33	1,06	1,06	1,15	0,180

Tabela A.5: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 05 (05-2012)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0366	0,0294	0,0367	0,0343	0,856	0,0369	0,0369	0,0369	0,0369	0,0431	0,0431	0,0431	0,0431	0,000
Yp/s	0,4600	0,4353	0,4418	0,4454	0,4408	0,958	0,4360	0,4358	0,4363	0,4360	0,4549	0,4547	0,4553	0,4550	0,000
Prod	2,50	2,49	2,52	2,54	2,52	1,007	2,48	2,48	2,48	2,48	2,46	2,46	2,46	2,46	0,000
VCS	5,80	5,72	5,70	5,71	5,71	0,984	5,68	5,69	5,68	5,68	5,77	5,78	5,77	5,77	0,004
Conv	90,00	99,56	99,71	99,71	99,66	1,107	99,85	99,85	99,85	99,85	90,18	90,18	90,18	90,18	0,000
Prod Esp	0,48	0,50	0,63	0,51	0,54	1,129	0,49	0,49	0,49	0,49	0,44	0,44	0,44	0,44	0,000
VCS esp	1,05	1,14	1,42	1,14	1,23	1,171	1,13	1,13	1,13	1,13	0,96	0,97	0,96	0,96	0,000

Tabela A.6: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 06 (01-2013)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0366	0,0294	0,0367	0,0343	0,856	0,0304	0,0375	0,0303	0,0327	0,0355	0,0438	0,0353	0,0382	0,004
Yp/s	0,4600	0,4353	0,4418	0,4454	0,4408	0,958	0,4538	0,4576	0,4542	0,4552	0,4735	0,4775	0,4739	0,4750	0,002
Prod	2,50	2,49	2,52	2,54	2,52	1,007	2,50	2,55	2,51	2,52	2,48	2,54	2,50	2,51	0,028
VCS	5,80	5,72	5,70	5,71	5,71	0,984	5,51	5,58	5,54	5,54	5,60	5,67	5,62	5,63	0,037
Conv	90,00	99,56	99,71	99,71	99,66	1,107	97,19	98,01	97,71	97,64	87,77	88,52	88,24	88,18	0,415
Prod Esp	0,48	0,50	0,63	0,51	0,54	1,129	0,62	0,51	0,63	0,59	0,55	0,45	0,55	0,52	0,067
VCS esp	1,05	1,14	1,42	1,14	1,23	1,171	1,37	1,11	1,38	1,29	1,17	0,95	1,18	1,10	0,152

Tabela A.7: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 07 (02-2013)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0366	0,0294	0,0367	0,0343	0,856	0,0371	0,0370	0,0369	0,0370	0,0433	0,0432	0,0431	0,0432	0,000
Yp/s	0,4600	0,4353	0,4418	0,4454	0,4408	0,958	0,4450	0,4392	0,4409	0,4417	0,4644	0,4583	0,4601	0,4609	0,003
Prod	2,50	2,49	2,52	2,54	2,52	1,007	2,52	2,49	2,50	2,50	2,50	2,47	2,49	2,49	0,013
VCS	5,80	5,72	5,70	5,71	5,71	0,984	5,66	5,67	5,68	5,67	5,75	5,76	5,77	5,76	0,011
Conv	90,00	99,56	99,71	99,71	99,66	1,107	99,93	99,93	99,93	99,93	90,24	90,24	90,24	90,24	0,000
Prod Esp	0,48	0,50	0,63	0,51	0,54	1,129	0,50	0,50	0,50	0,50	0,44	0,44	0,44	0,44	0,003
VCS esp	1,05	1,14	1,42	1,14	1,23	1,171	1,12	1,13	1,13	1,13	0,96	0,96	0,96	0,96	0,002

Tabela A.8: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 08 (03-2013)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0366	0,0294	0,0367	0,0343	0,856	0,0443	0,0441	0,0515	0,0467	0,0518	0,0515	0,0602	0,0545	0,004
Yp/s	0,4600	0,4353	0,4418	0,4454	0,4408	0,958	0,4437	0,4415	0,4397	0,4416	0,4630	0,4607	0,4588	0,4608	0,002
Prod	2,50	2,49	2,52	2,54	2,52	1,007	2,52	2,52	2,50	2,51	2,50	2,50	2,49	2,50	0,008
VCS	5,80	5,72	5,70	5,71	5,71	0,984	5,67	5,70	5,70	5,69	5,76	5,79	5,79	5,78	0,015
Conv	90,00	99,56	99,71	99,71	99,66	1,107	99,93	99,93	99,93	99,93	90,24	90,24	90,24	90,24	0,000
Prod Esp	0,48	0,50	0,63	0,51	0,54	1,129	0,42	0,42	0,36	0,40	0,37	0,37	0,31	0,35	0,035
VCS esp	1,05	1,14	1,42	1,14	1,23	1,171	0,94	0,94	0,81	0,90	0,80	0,81	0,69	0,77	0,077

Tabela A.9: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 09 (04-2013)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0449	0,0373	0,0299	0,0374	0,934	0,0322	0,0258	0,0257	0,0279	0,0345	0,0276	0,0275	0,0299	0,004
Yp/s	0,4600	0,4426	0,4406	0,4342	0,4391	0,955	0,4356	0,4435	0,4426	0,4406	0,4564	0,4646	0,4637	0,4615	0,004
Prod	2,50	2,45	2,45	2,41	2,44	0,976	2,83	2,89	2,89	2,87	2,90	2,96	2,96	2,94	0,031
VCS	5,80	5,54	5,57	5,56	5,56	0,958	6,51	6,51	6,52	6,51	6,79	6,79	6,81	6,80	0,009
Conv	90,00	85,47	85,85	85,67	85,66	0,952	99,11	99,23	99,36	99,23	104,12	104,26	104,39	104,26	0,128
Prod Esp	0,48	0,41	0,49	0,61	0,50	1,048	0,56	0,72	0,72	0,67	0,54	0,69	0,69	0,64	0,089
VCS esp	1,05	0,93	1,12	1,39	1,15	1,092	1,29	1,62	1,62	1,51	1,18	1,48	1,48	1,38	0,188

Tabela A.10: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 10 (05-2013)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0449	0,0373	0,0299	0,0374	0,934	0,0206	0,0206	0,0196	0,0202	0,0220	0,0220	0,0209	0,0217	0,001
Yp/s	0,4600	0,4426	0,4406	0,4342	0,4391	0,955	0,4486	0,4460	0,4513	0,4487	0,4699	0,4672	0,4728	0,4700	0,003
Prod	2,50	2,45	2,45	2,41	2,44	0,976	2,73	2,72	2,90	2,78	2,80	2,78	2,97	2,85	0,100
VCS	5,80	5,54	5,57	5,56	5,56	0,958	6,09	6,09	6,42	6,20	6,35	6,36	6,70	6,47	0,191
Conv	90,00	85,47	85,85	85,67	85,66	0,952	93,64	93,65	98,14	95,14	98,38	98,39	103,11	99,96	2,597
Prod Esp	0,48	0,41	0,49	0,61	0,50	1,048	0,9085	0,9041	0,9612	0,92	0,87	0,86	0,92	0,88	0,032
VCS esp	1,05	0,93	1,12	1,39	1,15	1,092	2,0252	2,0270	2,1295	2,06	1,85	1,86	1,95	1,89	0,060

Tabela A.11: Resultados dos ensaios da Cepa Nativa 11 (06-2013)

Parâmetros	Ref.	Padrão				Fator correção	Dados brutos				Dados corrigidos				Desvio Padrão
		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média		Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	Tri-1	Tri-2	Tri-3	Média	
Yx/s	0,0400	0,0293	0,0292	0,0295	0,0293	0,734	0,0295	0,0373	0,0226	0,0298	0,0402	0,0508	0,0308	0,0406	0,007
Yp/s	0,4600	0,4375	0,4382	0,4409	0,4389	0,954	0,4334	0,4407	0,4445	0,4395	0,4543	0,4619	0,4659	0,4607	0,006
Prod	2,50	2,49	2,50	2,49	2,49	0,997	2,45	2,46	2,46	2,46	2,46	2,47	2,47	2,46	0,006
VCS	5,80	5,69	5,71	5,64	5,68	0,979	5,65	5,58	5,53	5,59	5,77	5,70	5,65	5,71	0,059
Conv	90,00	90,10	90,67	89,61	90,13	1,001	90,16	89,04	88,49	89,23	90,03	88,92	88,36	89,10	0,853
Prod Esp	0,48	0,62	0,63	0,62	0,62	1,300	0,61	0,49	0,55	0,55	0,47	0,38	0,43	0,43	0,060
VCS esp	1,05	1,42	1,43	1,42	1,42	1,357	1,41	1,12	1,27	1,27	1,04	0,82	0,93	0,93	0,148

