

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO COMO COADJUVANTE NO
CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM UM PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM ESCALA INDUSTRIAL

FERNANDO HENRIQUE BUZO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

ARARAQUARA - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO COMO COADJUVANTE NO
CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM UM PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM ESCALA INDUSTRIAL

FERNANDO HENRIQUE BUZO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

ARARAQUARA - SP

2020

B992a Buzo, Fernando Henrique.
Aplicação de preparado enzimático como coadjuvante no controle de formação de espuma em um processo de fermentação alcoólica em escala industrial / Fernando Henrique Buzo. – Araraquara: [S.n.], 2020.
125 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Processo industrial de bioetanol. 2. Formação de Espuma. 3. Antiespumante. 4. Dispersante. 5. Preparado enzimático. I. Masarin, Fernando, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPE5: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO COMO COADJUVANTE NO CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM UM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM ESCALA INDUSTRIAL

AUTOR: FERNANDO HENRIQUE BUZO

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. BOUTROS SARROUH

Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos / Universidade Federal de São João Del-Rei

Prof. Dr. SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 31 de agosto de 2020

Agradeço a Deus, que nos criou e
abrilhantou sendo muito criativo nessa
etapa. Seu fôlego de vida em mim
atribuiu coragem para questionar
realidades e propor sempre um novo
mundo de possibilidades. Também ao
meu maior presente que Tu me deste
Senhor, a quem me abrilhantou durante
a descrição do trabalho e quem amarei
por toda a minha vida: “Luciane Cristina
Joaquim”.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Ana Maria Zanon Buzo e Aparecido Donizeti Buzo, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que chegasse até esta etapa da minha vida. Mãe, seu cuidado e dedicação foi o que me deram em alguns momentos a esperança para seguir em frente. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

À minha futura esposa, Luciane, pessoa especial com quem estou compartilhando momentos maravilhosos. Com você tenho me sentido mais vivo. Obrigado pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria da vida. Ter você ao meu lado foi o maior presente que Deus pode me dar, com você aprendi que o amor é o maior dos sentimentos, que o carinho é essencial que a vida é uma dádiva de Deus, que cada pequeno gesto é um grande gesto. Que o caminho certo está lá basta querer vê-lo.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Meu amado e adorado Deus, eu lhe agradeço e sou bem grato pelo presente maravilhoso que é a dádiva de estar com vida! E também pelas pessoas adoradas que tu me apresentaste nessa jornada aqui na Terra. Algumas delas me ajudam, inspiram, desafiaram e me encorajam a ser cada dia melhor. Eu agradeço ao Senhor, por todas as coisas boas e más que me aconteceram, sendo cada uma delas ao seu tempo determinado. Foi a minha jornada de vitórias e derrotas que me ajudaram a enxergar o verdadeiro significado e beleza da vida. Eu amo a minha vida e minha família, Senhor! Abençoa-nos com boa saúde, segurança, conforto, paz e alegria. Que todas as nossas preces e gratidão cheguem ao céu. Amém!

Aos meus amigos pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês as pausas, entre um intervalo e outro, são mais alegres e agradáveis.

Às pessoas com quem convivi nesse espaço ao longo desses anos. A experiência de produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação acadêmica. Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Masarin e ao Prof. Dr. Rondinelli Donizeti Herculano pela paciência e ajuda durante a realização do trabalho, aqui ficam meus sentimentos sinceros de muita gratidão, são esses profissionais que fazem o futuro mais criativo e desafiador.

A equipe da usina que não mediu esforços para esse sonho se tornar realidade, em especial aos gestores Renato Roncalli, Eduardo Alexandre Almeida e ao Gerente José Henrique Martins meus sinceros agradecimentos.

E a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos, fazendo esta vida valer a pena.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao curso de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO

A produção industrial de etanol combustível no Brasil é realizada por processo fermentativo com reciclo de células de leveduras. O processo industrial de produção de bioetanol resulta na formação de excesso de espuma. Assim, maiores níveis de contaminação e impurezas no processo fermentativo dificultam o controle da formação de espuma acarretando sérios problemas na operação do processo, como por exemplo, perdas financeiras devido a gastos excessivos com agentes antiespumantes e de fluidos por derramamento nas dornas de fermentação. Dentro do contexto apresentado, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho de um preparado enzimático comercial como agente antiespumante em processo industrial de produção de bioetanol. O preparado enzimático foi aplicado ao processo industrial concomitantemente aos insumos químicos tradicionais (antiespumante e dispersante). A aplicação foi conduzida pelo bombeamento do preparo enzimático para as dornas de fermentação denominando-se esta operação de “período enzima”. Prévio à aplicação do preparado enzimático um período controle foi avaliado “sem a adição do produto”, (foram realizados 2 ensaios a nível industrial nos anos de 2018 e 2019, respectivamente). O monitoramento do processo foi realizado pela quantificação dos insumos químicos, preparado enzimático e etanol. Além disso, também foram monitorados os indicadores de desempenho de um processo fermentativo. Os ensaios 1 e 2 apresentaram reduções médias no consumo de antiespumante e dispersante de 26% e 37%, respectivamente. No período enzima (ensaio 1) foi adotada a estratégia de reduzir o *mix* de produção de etanol culminando em reduções de vazão de mosto, produção de etanol e taxa de ocupação de dornas. O ensaio 1 resultou em valores similares de indicadores do processo fermentativo nos períodos enzima e controle, com exceção dos níveis de impurezas e floculação. No entanto, no ensaio 2 não foi adotada a estratégia de redução do *mix* de produção de etanol. Nesta condição, não houve diferenças significativas nos indicadores do processo fermentativo entre os períodos controle e enzima. O ensaio 1 apresentou redução líquida de 15%, enquanto o ensaio 2 aumento líquido de 9%, com recursos para aquisição de insumos químicos, o que totalizou uma economia de R\$ 0,40 no ensaio 1 e um prejuízo de R\$ 0,18 no ensaio 2 por metro cúbico de etanol produzido. Assim, somente o ensaio 1 apresentou redução de custos com aquisição de produtos químicos. Por fim, a diminuição do *mix* de produção de etanol foi o momento mais adequado para a aplicação do preparado enzimático no processo fermentativo.

Palavras-chave: Processo industrial de bioetanol; Formação de Espuma; Antiespumante. Dispersante; Preparado enzimático.

ABSTRACT

The industrial production of fuel ethanol in Brazil is carried out by a fermentative process with recycling of yeast cells. The industrial process of bioethanol production results in the formation of excess foam. Thus, higher levels of contamination and impurities in the fermentation make it difficult to control the formation of foam, causing serious problems in the operation of the process, such as financial losses due to excessive expenses with antifoaming agents and losses of fluids due to spillage in the fermentation vats. Within the context presented, the objective of the present work was to evaluate the performance of a commercial enzymatic preparation as a defoaming agent in an industrial bioethanol production process. The enzymatic preparation was applied to the industrial process concurrently with traditional chemical inputs (defoamer and dispersant). The application was carried out by pumping the enzymatic preparation into the fermentation vats denominated enzyme period". Prior to the application of the enzyme preparation, a control period was evaluated "without the addition of the product" (two tests were carried out in the years 2018 and 2019, respectively). The monitoring of the process was carried out by quantifying the chemical inputs, enzymatic preparation and ethanol. In addition, the performance indicators of a fermentation process were also monitored. Trials 1 and 2 showed average reductions in the consumption of defoamer and dispersant of 26% and 37%, respectively. In the enzyme period (test 1), the strategy of reducing the mix of ethanol production was adopted, culminating in reductions in must flow, ethanol production and rate of occupation of vats. Test 1 resulted in similar values of the fermentation process indicators in the enzyme and control periods, except for the levels of impurities and flocculation. However, in test 2, the strategy to reduce the ethanol production mix was not adopted. In this condition, there were no significant differences in the indicators of the fermentation process between the control and enzyme periods. Test 1 presented a net reduction of 15%, while test 2 a net increase of 9%, with resources for the acquisition of chemical inputs, which totaled savings of R \$ 0.40 in Test 1 and a loss of R \$ 0.18 in test 2 per cubic meter of ethanol. Thus, only trial 1 showed cost savings with the acquisition of chemicals. Finally, the decrease in the ethanol production mix was the most appropriate moment for the application of the enzyme preparation in the fermentation process.

Keywords: Industrial bioethanol process; Foam formation; Defoamer; Dispersant; Enzymatic preparation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral de produção industrial de etanol de cana-de-açúcar.	24
Figura 2. Formação de bolhas em dornas de processo industrial de produção e bioetanol. Fonte: próprio autor.	29
Figura 3. Esquema de formação de lamela entre as bolhas. Fonte: (CILLIERS et al., 1998).	30
Figura 4. Aeração de fluidos. Fonte: adaptado de NETO (2019).....	31
Figura 5. Delineamento dos ensaios de adição de preparado enzimático em processo industrial de produção de etanol. Fonte: próprio autor.	43
Figura 6. Dornas de fermentação do processo industrial de produção de bioetanol. Fonte: próprio autor.	44
Figura 7. Layout do parque de fermentação. Dorna 01 e 05: conjunto interligado de 3 tanques para formar uma dorna, possuindo capacidade 1.050 m ³ (dorna 1) e 1.050 m ³ (dorna 05); Dorna 02, 03, 04 e 07: tanque único, possuindo capacidade volumétrica de 1.000 m ³ cada dorna; Dorna 06 e 08: conjunto único, possuindo capacidade volumétrica de 2.100 m ³ cada dorna. Fonte: próprio autor.....	45
Figura 8. Trocador de calor das dornas de fermentação do processo industrial de produção de bioetanol. Fonte: próprio autor.	46
Figura 9. Rotor de centrifuga (Alfa Laval). Fonte: Empresa Alfa Laval.....	47
Figura 10. Tanques de antiespumante. Fonte: próprio autor.....	48
Figura 11. Estrutura de dosagem de antiespumante. Fonte: próprio autor.	49
Figura 12. Tanques de Dispersante. Fonte: próprio autor.	50
Figura 13. Estrutura de dosagem de dispersante. Fonte: próprio autor.	51
Figura 14. Representação de container de dosagem de preparado enzimático Fermax-TM (Novozymes). Fonte: próprio autor.	53

Figura 15. Estrutura de dosagem de preparado enzimático Fermax-TM (Novozymes), ensaio 1. Fonte: próprio autor.	54
Figura 16. Estrutura de dosagem de preparado enzimático Fermax-TM (Novozymes), ensaio 2. Fonte: próprio autor.	55
Figura 17. Sistema de amostragem de mosto. Fonte: próprio autor.....	56
Figura 18. Sistema de amostragem contínua do vinho. Fonte: próprio autor.	57
Figura 19. Ponto de coleta de amostra do fermento tratado. Fonte: próprio autor. ..	58
Figura 20. Consumo de antiespumante em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de antiespumante por metro cúbico de etanol produzido = Ra/e). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.	62
Figura 21. Consumo de dispersante em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de dispersante por metro cúbico de etanol produzido, Rd/e). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.....	64
Figura 22. Consumo de preparado enzimático em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de preparado enzimático por metro cúbico de etanol, Re/e). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.	66
Figura 23. Aspecto visual da formação de espuma nas cubas de fermento tratado em processo industrial de produção de bioetanol. (ac) Período Controle, sem preparado enzimático. (bd) Período Enzima, com preparado enzimático. (ab) Ensaio 1. (cd) Ensaio 2. Fonte: Autor próprio.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de espumas. Fonte: GHILDYAL et al. (1988).....	31
Tabela 2. Características almeçadas para os agentes antiespumante.....	38
Tabela 3. Procedimentos analíticos realizados durante as amostragens do processo industrial de produção de bioetanol.	59
Tabela 4. Consumo de antiespumante, dispersante e preparado enzimático em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de insumo por metro cúbico de etanol produzido, Ra/e, Rd/e e Re/e, respetivamente).	63
Tabela 5. Monitoramento de indicadores de desempenho do processo fermentativo de produção de bioetanol.....	70
Tabela 6. Avaliação de custos dos ensaios 1 e 2 realizados no processo fermentativo de produção de bioetanol.....	74

LISTA DE SÍMBOLOS

R_{a/e} Relação de consumo de antiespumante/volume de etanol produzido

R_{d/e} Relação de consumo de dispersante/volume de etanol produzido

R_{e/e} Relação de consumo de preparado enzimático/volume de etanol produzido

R_{dc/e} Relação de consumo de dióxido de cloro/volume de etanol produzido

VVHP *Very Very High Polarized*

CO₂ Dióxido de carbono

Proálcool Programa Nacional do Álcool

Etanol 2G Etanol celulósico

INPM Instituto Nacional de Pesos e Medida

ppm Partes por milhão

DQO Demanda química de oxigênio

DBO Demanda biológica de oxigênio

CLP Controlador lógico programável

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVO.....	19
2.1.	GERAL	19
2.2.	ESPECÍFICOS.....	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1.	CONTEXTO HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DO ETANOL COMBUSTÍVEL.....	20
3.2.	MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	22
3.3.	PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR	24
3.4.	FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL	28
3.4.1.	TIPOS DE ESPUMA.....	30
3.4.2.	FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE ESPUMA	32
3.4.3.	EFEITOS DA FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO FERMENTATIVO	35
3.5.	MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO FERMENTATIVO	36
3.6.	PREPARADO ENZIMÁTICO PARA CONTROLE DE ESPUMA NA FERMENTAÇÃO	40
4.	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1.	DELINEAMENTO DE ENSAIOS DE ADIÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO EM PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	43
4.2.	ESTRUTURA DO COMPLEXO DO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	44
4.3.	ESTRUTURA DE DOSAGEM DE ANTIESPUMANTE	47
4.4.	ESTRUTURA DE DOSAGEM DE DISPERSANTE	49
4.5.	ESTRUTURA DE DOSAGEM DE PREPARADO ENZIMÁTICO	52

4.5.1.	ESTRUTURA DE APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO (ENSAIO 1)	52
4.5.2.	ESTRUTURA DE APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO (ENSAIO 2)	54
4.6.	AMOSTRAGEM NO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL	56
4.6.1.	MOSTO	56
4.6.2.	VINHO LEVEDURADO	57
4.6.3.	FERMENTO TRATADO	57
4.7.	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	58
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO NO CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL	61
5.2.	AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE DESEMPENHO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO	69
5.3.	AVALIAÇÃO DE CUSTO DA APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO NO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL	73
6.	CONCLUSÃO	76
7.	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A. METODOLOGIA DE ANÁLISES LABORATORIAIS	86
	APÊNDICE B. TESTES DE TUKEY REFERENTES A TABELA 4. DOSAGEM DE INSUMOS	92
	APÊNDICE C. TESTES DE TUKEY REFERENTES A TABELA 5. VARIÁVEIS DO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL	95
	APÊNDICE D. GRÁFICOS REFERENTES À TABELA 5. VARIÁVEIS DO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL	110

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, um dos maiores produtores agrícolas do mundo, gera quantidades significativas de subprodutos de biomassa em atividades decorrentes da colheita e transformação de produtos. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020), na safra 2019/20, foram obtidos 630 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. A produção brasileira de etanol, no mesmo período, foi acima de 29,2 bilhões de litros.

Uma parcela dessa produção provém da unidade de estudo, localizada no interior paulista, onde são processadas 5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, obtendo-se como produtos o etanol combustível (184 mil metros cúbicos), o açúcar VVHP “*Very Very High Polarized*” (7 milhões de sacos) e levedura seca (3,7 toneladas). A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (combustível renovável) permite uma redução de aproximadamente 78% das emissões de gás carbônico (CO₂) no planeta Terra, pois a cana-de-açúcar capta o CO₂ da atmosfera e transforma em oxigênio (via processo de fotossíntese). O Brasil faz uso intensivo dessa energia de baixo índice de carbono para movimentar a sua frota de veículos e isso ocorre desde 1975, quando foi criado o Proálcool como alternativa à crise do petróleo (ZANIN *et. al.*, 2000).

O presente trabalho foi desenvolvido em uma das etapas de produção do bioetanol, ou seja, a fermentação alcoólica sacarina, sendo um processo biológico no qual os açúcares (glicose, frutose e sacarose) presentes no caldo de cana-de-açúcar processado,

denominado de mosto, são metabolizados pela levedura *Saccharomyces Cerevisiae*, obtendo-se o vinho fermentado. Além do vinho fermentado com etanol, outros subprodutos são liberados no presente bioprocesso, sendo os principais o CO₂, glicerol, ácido succínico, ácido acético, óleo fúsel, butilenoglicol, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros (ALENCAR *et al.*, 2009).

O tema principal do trabalho refere-se ao excesso de formação de espuma nos biorreatores (dornas) de fermentação, o que é indesejável no processo de produção de bioetanol, pois provoca dificuldades operacionais e de desempenho. Há grandes dificuldades no controle de formação de espuma, pois a formação de bolhas ocorre quando os constituintes (CO₂, proteínas e sólidos suspensos presentes no mosto e vinho) estão em contato no processo de fermentação. Um nível de formação de espuma está sempre presente nas dornas de fermentação, porém quando em excesso torna-se um obstáculo, afetando de forma negativa a produtividade do processo (PAGILLA *et al.*, 2014). Em geral, os principais impactos negativos causados pela formação excessiva de espuma em processos de fermentação alcoólica são: redução do desempenho da dorna de fermentação pela diminuição do volume ativo, resultando em menor produtividade de etanol por ciclo; redução de custos financeiros com dosagem de produtos químicos para dispersão e contenção de espuma.

O preparado enzimático (Fermax TM) é uma alternativa biológica para o controle de formação de espuma em processo

industrial de produção de bioetanol. Ao contrário dos produtos químicos tradicionais (antiespumantes e dispersantes), o Fermax TM não elimina a espuma, mas impede que ela se forme, pois altera a estrutura da mesma clivando as ligações do tipo peptídica das proteínas estabilizadoras, tornando-a mais leve e menos densa (NOVOZYMES, 2020). O Fermax TM pode substituir completamente ou ser utilizado em combinação com produtos químicos tradicionais para potencializar sua atividade.

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho de um preparado enzimático comercial como agente coadjuvante no controle de espuma em processo industrial de produção de bioetanol.

2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar um período denominado de “controle” (estratégia típica aplicada atualmente no processo), no qual foram utilizados apenas insumos químicos tradicionais (antiespumante e dispersante) no controle de formação de espuma nas dornas de fermentação;
- Avaliar um período denominado de “enzima”, no qual foram dosados o preparado enzimático (Fermax-TM-Novozymes), além de dispersante e antiespumante nas dornas de fermentação;
- Avaliar os custos financeiros da aplicação do preparado enzimático em combinação com dispersante e antiespumante no processo industrial de produção de bioetanol;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CONTEXTO HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DO ETANOL COMBUSTÍVEL

Quando se aborda o tema etanol no Brasil, há de se lembrar do Governo do presidente Getúlio Vargas no qual criaram o IAA (Instituto do Açúcar e Alcool), sendo esse fato de grande importância e contribuição para o desenvolvimento da indústria sucroalcooleira no país (YOSHII *et al.*, 1984). Após a criação do IAA, foram implementadas regras e diretrizes no rumo das decisões da agroindústria canavieira em todo o território nacional. Em meados dos anos de 1930, pouco depois da Revolução, os representantes do governo baixaram o decreto, nº 19.717, tornando obrigatória a adição de 5% de etanol carburante à gasolina importada de outros países. Também no mesmo decreto ocorreu a isenção de taxas e impostos dos materiais necessários à expansão produtiva das destilarias existentes no país naquele período (SZMRECSÁNYI, 1979).

Por volta de 1975 foi criado o “Proálcool” (Programa Nacional do Alcool), sendo esse um fato de grande importância para época, já que o Brasil importava aproximadamente 80% do petróleo que consumia internamente. O objetivo do programa foi diminuir a dependência do país em relação ao petróleo, sendo essa, uma resposta do país ao recente “Choque do Petróleo” (ZANIN *et al.*, 2000). De 1985 a 1989 ocorreram dificuldades para a implementação do “Proálcool”, pois o Brasil enfrentava diversas

alterações econômicas, como por exemplo, aumento da inflação e da dívida. O mercado internacional vinha apresentando diminuição no preço do petróleo, portanto os problemas de abastecimento de etanol passaram a não ter grandes destaques. No ano de 1984, o país encontrava-se sob uma nova administração que cortou os investimentos públicos e os subsídios, extinguindo o IAA criado por Vargas.

Atualmente o que se espera do futuro dos biocombustíveis no Brasil é que até 2030 o Brasil aumente consideravelmente a produção etanol, pois se trata da retomada dos investimentos no setor sucroenergético, devendo as atenções voltarem-se para a evolução da implementação do “RenovaBio” que pretende (BRASIL, 2017):

- Fornecer uma importante contribuição para o cumprimento dos compromissos determinados pelo Brasil no âmbito do Acordo de Paris;
- Promover a adequada expansão dos biocombustíveis na matriz energética, com ênfase na regularidade do abastecimento de combustíveis;
- Assegurar previsibilidade para o mercado de combustíveis, induzindo ganhos de eficiência energética e de redução de emissões de gases causadores do efeito estufa.

Nesse ambiente de incertezas (devido às alterações no governo), espera-se que prevaleçam políticas que possam dar

suporte ao aumento da produção de etanol no médio prazo. Como o “RenovaBio” não requer subsídio e renúncia fiscal, supõe-se que o programa seja aderente às propostas do novo governo e que dê suporte para evolução da indústria sucroenergética do país, impulsionando o desenvolvimento, sendo esse o cenário futuro da matriz dos biocombustíveis no Brasil.

3.2. MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

As matérias-primas com potencial para produção de bioetanol contém uma mistura de sacarose, glicose e frutose. Essa matéria-prima é transformada pela levedura *Saccharomyces Cerevisae* em etanol por meio do bioprocessamento denominado fermentação alcoólica.

Para que ocorra esta reação de biotransformação, é necessário que a matéria-prima contenha carboidratos metabolizáveis pelas leveduras. Os açúcares monoméricos de seis carbonos, como a glicose e frutose, além do dímero de sacarose (glicose + frutose) são os preferidos da levedura *S. Cerevisae* para produzir etanol. Do ponto de vista de fermentação, as matérias-primas podem ser agrupadas nos seguintes grupos:

Sacarina: diretamente fermentescíveis, como por exemplo: frutas, mel de caldo de cana-de-açúcar, beterraba, que não precisam sofrer conversão previa do carboidrato antes da fermentação, de modo a torná-lo assimilável pela levedura. Todavia, a levedura usa a enzima invertase para decompor a molécula de sacarose em glicose e frutose (LIMA *et al.*, 2019).

Amiláceas e feculentas: indiretamente fermentescíveis, ou seja, necessitam ser convertidas em carboidratos diretamente fermentescíveis prévio ao início da fermentação etanólica, de modo a ser assimilável pela levedura. O principal constituinte é polissacarídeo amido, um polímero que contém unidades repetitivas de moléculas de glicose. São exemplos de matérias-primas amiláceas: milho, arroz, trigo, mandioca, batata doce, dentre outros. As matérias-primas amiláceas possuem como principal característica a fermentação etanólica pós-hidrólise (enzimática ou química), também denominada de processo de sacarificação, no qual o substrato amido não fermentescível é transformado em glicose (açúcar monomérico) que pode ser convertido em etanol diretamente pela levedura (LIMA *et al.*, 2019).

Celulósicas: matérias-primas também indiretamente fermentescíveis. Alguns exemplos de materiais celulósicos são a palha e o bagaço de cana-de-açúcar, madeiras e subprodutos agrícolas. As matérias-primas celulósicas (materiais lignocelulósicos) despertam interesse para produção de etanol, porém alguns fatores resultam em menor uso dessa matéria-prima, entre eles podemos citar: dificuldade de preparação do mosto, presença de elementos tóxicos nos substratos previamente hidrolisados, causando efeitos inibitórios no processo de fermentação etanólico, resíduos de açúcares não fermentescíveis ao final do processo de fermentação (2-3%) resultando em baixa eficiência e muitos subprodutos na etapa de destilação,

necessidade de pré-tratamento químico e hidrólise enzimática dos materiais devido à alta recalcitrância, culminando em alto custo do processo, dentre outros (LIMA *et al.*, 2019).

3.3. PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR

A Figura 1 ilustra o fluxograma geral da produção industrial de bioetanol utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar.

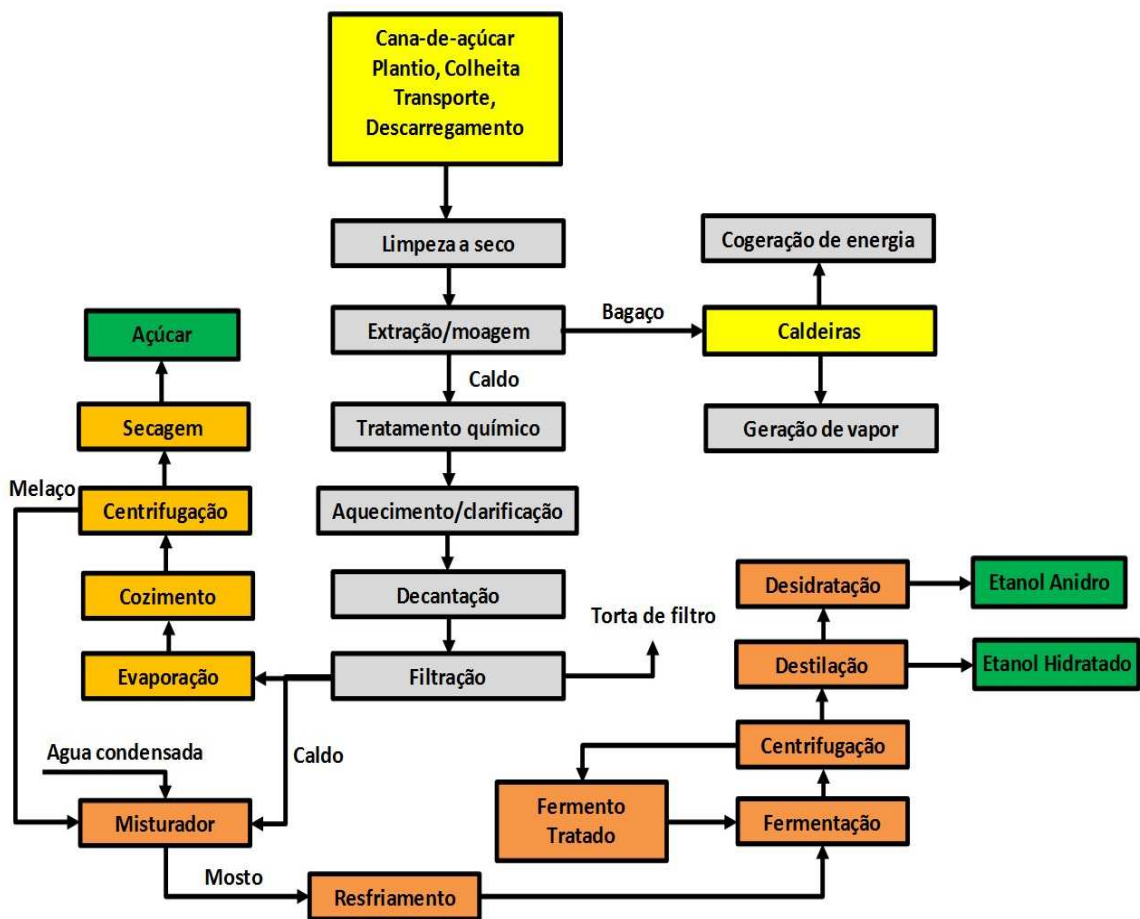


Figura 1. Fluxograma geral de produção industrial de etanol de cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar é transportada da área de cultivo para a indústria por caminhões, na balança o material é pesado e

amostrado para realização das análises preliminares. Assim, a cana-de-açúcar é descarregada nos tombadores, onde são realizadas as operações de limpeza a seco (removendo-se impurezas em geral) e na sequência pelos eletroímãs (remoção de partículas ferrosas). Após a limpeza, a cana-de-açúcar é transportada por meio de esteiras até o conjunto de facas e martelos para ser desfibrada e triturada, nesta etapa são geradas duas frações: o caldo de cana-de-açúcar (fração líquida) e um subproduto fibroso denominado de bagaço de cana-de-açúcar (fração sólida) (REIN, 2013).

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta uma umidade da ordem de 50% e é utilizado como material comburente para geração de vapor e cogeração de energia, além disso, também é utilizado em algumas unidades industriais para a produção de etanol celulósico (etanol 2G) (MILANEZ *et al.*, 2015).

O caldo de cana-de-açúcar é concentrado na etapa de evaporação, obtendo os cristais de sacarose (massa concentrada), sendo separados pelo processo de centrifugação obtendo-se o açúcar, gerando como subproduto um material viscoso saturado de sacarose, denominado de melaço de cana-de-açúcar. O melaço possui como característica ser um líquido denso e viscoso, de cor escura, rico em açúcares, contendo pequeno percentual de água, com densidade que varia entre 1,4-1,5 g.mL⁻¹.

Algumas destilarias optam por utilizar apenas o caldo de cana-de-açúcar para a produção de etanol, por possuir maior qualidade,

baixa acidez e não apresentar resíduos de insumos industriais (contendo enxofre), enquanto que outras unidades, utilizam somente o melaço, porém, a mistura é considerada como sendo um substrato com elevados índices nutricionais em comparação ao caldo de cana-de-açúcar (que possui algumas deficiências nutricionais), mas por outro lado, o melaço possui compostos inibidores da fermentação que devem ser monitorados com cautela (ANDRIETTA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2001). Desta forma, o pH do caldo de cana-de-açúcar é previamente corrigido para aproximadamente 6,8 com adição de cal Clarisina pelo sistema Hidratec e em seguida é aquecido a uma temperatura de 105 °C para eliminar microrganismos indesejados e compostos com características de formação de géis (etapa de clarificação). Em seguida o caldo cana-de-açúcar previamente clarificado é bombeado aos decantadores com o objetivo de retirar impurezas minerais (denominadas de lodo). O caldo cana-de-açúcar é ainda filtrado para a retirada de sólidos suspensos, dessa forma, obtendo-se um uma solução mais limpa, tornando o processo de fermentação mais eficaz, diminuindo a formação de espuma na fermentação e impregnando menos as centrifugas de etanol. O caldo cana-de-açúcar é então bombeado para o misturador estático (podendo ser misturado com melaço e água condensada de acordo com a proporção de produção e estratégia adotada pela empresa) e homogeneizado. Em seguida o caldo homogeneizado a 65 °C, é

bombeado aos trocadores de calor, onde é resfriado a aproximadamente 30 °C, sendo denominado de mosto.

O mosto é resfriado e bombeado para as dornas de fermentação (preparado por mistura de caldo de cana-de-açúcar, melaço e água condensada, em proporção determinada de acordo com a estratégia de produção). O mosto contém entre 18-22% de açúcares e é inoculado com uma suspensão de células de leveduras de *S. Cerevisiae* comerciais (diferentes cepas comerciais de acordo com a estratégia da empresa), denominada de levedo ou fermento. A fermentação é finalizada dentro de 8-10 h, resultando em vinho fermentado com 8-12% (volume/volume) de etanol. Ao final da etapa de fermentação, o vinho fermentado é bombeado para a operação de centrifugação, separando-se as células de levedura, resultando em uma suspensão concentrada de células, denominada de "creme de leveduras" que contém 60-70% de concentração. O creme de levedura é diluído com água e tratado quimicamente (ácido sulfúrico e desinfetantes) a fim de reduzir o nível de contaminação bacteriano e o fermento obtido é reciclado para uma próxima etapa de fermentação. O processo de fermentação etanólico é operado em batelada alimentada com reciclo de leveduras, e o vinho centrifugado é destinado ao processo de destilação para obtenção de etanol hidratado carburante com graduação de 92,8 INPM (%massa/massa). Após, a etapa de destilação, um subproduto líquido denominado de vinhaça é produzido na proporção de 9-13 litros para cada litro de etanol, o qual é utilizado como água de

irrigação e fertilização de solo, pois apresenta elevados índices de potássio (da ordem de 2700 ppm), que em quantidades moderadas é um excelente adubo para plantações de cana-de-açúcar na etapa do preparo de terra.

Na etapa de produção de etanol anidro o etanol hidratado é utilizado como matéria-prima, submetendo-o ao processo de desidratação, o qual utiliza as seguintes tecnologias: peneira molecular, ciclohexano ou monoetilenoglicol, a função de ambas as tecnologias é remover o percentual de aproximadamente 7% de água do etanol (o qual não é removido na etapa de destilação) tornando-o mais puro, obtendo-se o etanol anidro com uma graduação de aproximadamente 99,7 INPM (% massa/massa).

3.4. FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

A formação de espuma é o tema principal do presente trabalho não havendo muitas informações disponíveis na literatura especializada. A espuma é frequentemente observada em processos fermentativos, principalmente em biorreatores aerados e agitados.

Muitos fatores podem contribuir para a estabilidade e o padrão de formação de espuma. A formação de espuma está associada às condições hidrodinâmicas, ou seja, ao movimento dos fluidos e às forças que atuam sobre corpos sólidos imersos nos fluidos, que por sua vez, são afetadas pelas seguintes variáveis: formação de CO₂,

composição do meio, presença de células em crescimento e impurezas presentes no mosto.

Os problemas gerados pela formação excessiva de espuma se enquadram em duas classes: os causados pela característica do biorreator e os causados por parâmetros operacionais. Embora os sistemas de controle de espuma sejam amplamente utilizados na indústria, é preferível prevenir a formação de espuma sem causar efeitos prejudiciais sobre a produtividade do processo.

Desta forma, o tema possui um grau de complexidade elevado e ainda é necessária uma extensa pesquisa científica para elucidar o mecanismo exato dessas interações, para que previsões realistas do comportamento de formação de espuma em processos fermentativos possam ser realizadas (TAPIA *et al.*, 2016).

As espumas são compostas por milhares de pequenas bolhas (CILLIERS *et al.*, 1998), sendo geradas dentro de um líquido, conforme apresentado na Figura 2.



Figura 2. Formação de bolhas em dornas de processo industrial de produção e bioetanol. **Fonte:** próprio autor.

Essas bolhas se elevam e flutuam, acumulando-se na superfície do líquido, ocorrendo a formação de uma lamela

(“Plateau”), ou seja, película fina que se encontra entre as bolhas, conforme apresentado na Figura 3 (CILLIERS *et al.*, 1998).

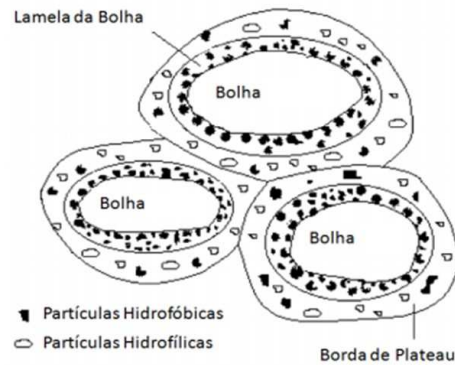


Figura 3. Esquema de formação de lamela entre as bolhas. **Fonte:** (CILLIERS *et al.*, 1998).

A formação de espuma ocorre quando o líquido intermediário entre duas bolhas diminui para uma lamela, ao invés de se romper no ponto de aproximação mais próximo.

3.4.1. TIPOS DE ESPUMA

Quando uma solução contendo um surfactante (composto que reduz a tensão superficial de uma solução, como os detergentes, emulsificantes, antiespumantes e dispersantes) é aerada, as bolhas sobem em direção à superfície e duas regiões distintas se formam, conforme apresentado na Figura 4.

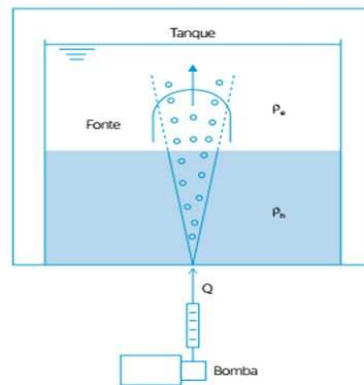


Figura 4. Aeração de fluidos. **Fonte:** adaptado de NETO (2019).

Com base em suas características, as espumas são classificadas em diferentes categorias (Tabela 1). Em geral, espumas fluidas são encontradas em processos submersos e podem ser classificadas como instáveis, metaestáveis, transitórios e persistentes.

Tabela 1. Classificação de espumas. **Fonte:** GHILDYAL *et al.* (1988).

Tipos	Características
Instável	O estado de equilíbrio é abordado continuamente
Metaestável	O progresso para o estado de equilíbrio é interrompido
Transitório	Vida útil de segundos
Persistente	Vida útil de horas ou dias, se não for perturbada

A espuma instável se aproxima continuamente do estado de equilíbrio, constantemente se decompõe à medida que o líquido fica mais seco entre as bolhas, sua vida útil depende da concentração da solução (MANCY *et al.*, 1960).

A espuma metaestável é caracterizada pelo fato de que a secagem do líquido entre as bolhas pode ser interrompida e a espuma pode persistir indefinidamente, se absolutamente protegida

de influências perturbadoras, incluindo vibrações, correntes de ar, evaporação, calor radiante, diferenças de temperatura, poeira e outras impurezas (BEROVIC, 1990; FAMEAU, 2013).

A metaestabilidade pode ser conferida à espuma pela presença de um soluto, ou seja, (substância que se encontra em menor quantidade) que é adsorvido positivamente na superfície e requer trabalho para removê-la.

A formação de espuma em processos fermentativos está diretamente relacionada às características do sistema, ou seja, equipamentos, métodos, fluidos e também das variáveis operacionais que o compõe. As subseções 3.4.2 e 3.4.3 apresentam os fatores que contribuem para a formação de espuma e os efeitos que a espuma provoca no processo de fermentação.

3.4.2. FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE ESPUMA

Em um bioprocessos a estabilidade e o padrão de formação de espuma são afetados por vários fatores, que muitas vezes dependem das condições hidrodinâmicas dos fluidos do processo, que por sua vez, são influenciadas pelos seguintes fatores: a) natureza e composição do meio, b) vazão de alimentação, c) presença excessiva de agentes surfactantes, d) substâncias ativas de superfície, e) temperatura da fermentação (NOBLE *et al.*, 1994).

a) Natureza e composição do meio (pH; concentração de sais, proteínas na presença de álcoois)

As proteínas das células da levedura *S. Cerevisae* têm menor solubilidade e maior potencial de formação de espuma em seu ponto isoelétrico. Portanto, a capacidade de formação de espuma pode ser influenciada pelo pH do meio (URAZEE *et al.*, 1990; SPEROTTO, 2014). A eficácia de agente antiespumantes biológicos (enzimas) também pode depender do pH, como por exemplo, o preparado enzimático Fermax TM.

A espuma das soluções do processo fermentativo aumenta na presença de sais, sendo um dos grandes contribuintes o mosto composto por melação, pois contém substâncias ricas em sais minerais (BEROVIC, 1990; BEROVIC *et al.*, 1979; SPEROTTO, 2014).

Segundo Bumbullis *et al.* (1979) e Tapia *et al.* (2016), proteínas na presença de álcoois, como por exemplo, etanol, metanol e propanol (concentrações de 2%, volume/volume) resulta em aumento aparente da concentração das moléculas de proteína, ocasionando maior formação de espuma.

b) Vazão de alimentação

As condições de operação do reator fermentativo, como por exemplo, a vazão de alimentação e agitação do meio, também influenciam na formação de espuma. Desta forma, o aumento da vazão de alimentação é proporcional ao aumento da altura da

camada de espuma, pois há aumento da atividade fermentativa, facilitando que mais bolhas de gás cheguem à superfície convertendo-as em espuma. Em alguns casos, a espessura da camada de espuma pode diminuir com o aumento da vazão de alimentação após atingir uma espessura máxima. As razões para isso não são claras, mas pode ser devido a uma diminuição do diâmetro das bolhas (DUITSCHAEVER *et al.*, 1988; RAZAK *et al.*, 2015).

c) *Presença excessiva de agentes surfactantes*

A concentração excessiva de agentes antiespumantes ou dispersantes também provoca o aumento da formação de espuma. Geralmente, a estabilidade da espuma diminui até uma concentração máxima de surfactante, mas concentrações acima desse patamar aumentam a estabilidade da espuma. No entanto, a estabilidade da espuma não é sempre aditiva: a adição de um agente capaz de formar espuma pode destruir a espuma existente se for de carga oposta (PRINS, 1987; ROUTLEDGE, 2012).

d) *Substâncias ativas de superfície*

A presença de substâncias ativas de superfície ou sólidos suspensos (impurezas minerais e/ou vegetais) tende a estabilizar os filmes líquidos, como é o caso da levedura *S. Cerevisae*, pois os materiais ativos de superfície são adsorvidos nas partículas sólidas, com extremidades não polares orientadas para a fase

aquosa de modo que as bolhas de ar aderem-se a elas, resultando em uma estabilização da bolha e em um maior tempo de permanência contribuindo em dificuldades de rompimento da espuma nas dornas fermentativas (HALL *et al.*, 1971; ZEDNIKOVA *et al.*, 2019).

e) Temperatura da fermentação

A formação de espuma é diretamente proporcional à temperatura, pois temperaturas mais elevadas resultam em aumento da drenagem de líquidos, diminuindo a viscosidade. A temperatura elevada também pode aumentar a evaporação de componentes voláteis da superfície, além disso, ocorre a desnaturação de proteínas das leveduras, aumentando a formação de espuma. À indícios que o aumento da temperatura resulte em reações químicas de moléculas de açúcares redutores, aminoácidos, proteínas e peptídeos através da reação de Maillard (BEROVIC, 1990; BEROVIC *et al.*, 1979; FANG, 2009).

3.4.3. EFEITOS DA FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO FERMENTATIVO

Os efeitos da formação de espuma em processos fermentativos são bastante numerosos e são listados abaixo:

- Aumento do volume efetivo das dornas de fermentação, causando redução da produção de etanol;

- Maior retenção de gás, gerando bolhas no rotor do sistema de bombeamento de resfriamento, causando aumento da temperatura do vinho fermentado das dornas do processo;
- Perda de fluido devido a derramamentos, resultando em menor produtividade de etanol;
- Gastos financeiros para aquisição de produtos químicos para controle de formação de espuma;
- Deposição de células na parte superior do biorreator, causando aumento da contaminação microbiológica presente no vinho fermentado;

Desta forma, o controle de formação de espuma em processos fermentativos é imprescindível para se obter bons resultados. A estratégia adotada preferencialmente pelas indústrias é prevenir à formação de espuma, ao invés de eliminar a espuma que já está formada. No entanto, às vezes a formação de espuma é inevitável e devem ser utilizados os métodos de eliminação de espuma.

3.5. MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO FERMENTATIVO

Os agentes químicos (antiespumantes) são substâncias ativas da superfície que impedem a formação de espuma metaestável. A espuma é eliminada ao se atingir a superfície do líquido e as substâncias depositadas nas lamelas das bolhas.

Os agentes antiespumantes a fim de desestabilizar a formação de espuma em processos fermentativos podem ser produzidos a

base de óleos, ácidos graxos, ésteres, poliglicóis, siloxanos, álcoois, sulfitos e sulfonatos. O modo de ação de um agente químico antiespumante depende da natureza do composto, do tipo da espuma e da natureza das substâncias que provocam a formação de espuma.

Gotas de agentes antiespumantes podem desestabilizar filmes de proteínas por vários mecanismos. Eles podem atuar como pontes hidrofóbicas entre duas superfícies de filme. Para que esse mecanismo opere, a gota de óleo deve entrar no filme; assim, o diâmetro da gota deve ser menor que a espessura do filme. Portanto, o óleo deve ser adicionado como uma emulsão. Com base nesse mecanismo, é plausível que gotículas muito pequenas produzam apenas uma pequena quantidade de movimento da superfície e que o filme permaneça estável. Consequentemente, existe um tamanho ideal de gota para o colapso do filme. Quando um elemento hidrofóbico entra em contato com ambas as superfícies de um filme, uma superfície convexa é formada no filme líquido. O líquido flui em direção contrária do elemento hidrofóbico devido ao aumento da pressão sob a superfície curva; portanto, o filme entra em colapso (GHILDYAL *et al.*, 1988).

Os agentes antiespumantes são normalmente adicionados sob demanda quando o conteúdo do biorreator está espumando vigorosamente; portanto, é necessária uma ação antiespumante rápida para evitar derramamentos de fluidos. Para garantir um grande coeficiente de espalhamento positivo, a tensão interfacial

entre o antiespumante e o meio espumante também deve ser baixa. Isso requer algum caráter hidrofílico na molécula antiespumante. O agente antiespumante deve ser fornecido em quantidade suficiente para manter uma alta concentração superficial, mesmo sob as condições dinâmicas encontradas em um biorreator; portanto, uma baixa solubilidade é vantajosa. Além disso, o antiespumante deve ter baixas forças coesivas intermoleculares para que ele próprio não contribua para a viscosidade ou rigidez da superfície.

As características desejadas de um agente antiespumante ideal foram reportadas na literatura (BRYANT, 1970; EVANS *et al.*, 1971). Algumas dessas propriedades são mutuamente contraditórias e nenhum agente antiespumante pode ter todas as propriedades desejadas (Tabela 2).

Tabela 2. Características almeçadas para os agentes antiespumante.

Características almeçadas	
Eliminação rápida de espuma	Estabilidade durante a descontaminação
Ação duradoura	Insolubilidade em meio espumante
Não explosivo	Nenhuma interação química com o produto acabado
Não volátil	Não transmite cor ou odor ao produto
Baixo custo	Melhor capacidade de eliminar a elasticidade e viscosidade da superfície. Biodegradável
Não tóxico para microrganismos, animais e humanos	Altos coeficientes de entrada e difusão
Valores baixos de DBO e DQO	Incapacidade de formar produtos corrosivos
Não metabolizável pela cepa microbiana em uso	Descontaminação/fermentação
Baixa tensão superficial	Presença de algum caráter hidrofóbico

Os efeitos de minimização da formação de espuma e, com isso, aumento de produtividade de etanol em processo fermentativo são bem conhecidos. De fato, antiespumantes e dispersantes são adicionados a quase todos os processos fermentativos. No entanto, o uso de antiespumantes introduz uma dimensão adicional ao processo produtivo. Os efeitos dos agentes antiespumantes não são todos benéficos. O antiespumante pode afetar negativamente o metabolismo microbiano e a qualidade do produto final (GHILDYAL *et al.*, 1988; HALL *et al.*, 1971). Desta forma, as identificações das relações causa-efeito específicas são difíceis de serem determinadas.

Os agentes antiespumantes pertencem a diferentes grupos de tensoativos e podem afetar o processo de maneira diferente, sendo seus efeitos muitas vezes prejudiciais ao metabolismo microbiano sendo tóxicos para os microrganismos. Esses efeitos aumentam ou diminuem o crescimento microbiano, a formação do produto e a utilização do substrato. Os sistemas de enzimas microbianas podem ser danificados por alguns dos óleos utilizados como transportadores, fazendo com que as taxas de metabolização de açúcares diminuam e a produção de metabólitos desejados, como antibióticos, seja inibida. Portanto, para a produção de enzimas, são preferidos agentes antiespumantes inertes que não podem ser metabolizados pelos microrganismos. Agentes antiespumantes que são metabolizados durante a fermentação são frequentemente

usados para produção secundária de metabólitos. Quando um agente antiespumante metabolizável é usado, o processo fermentativo pode exibir um comportamento dialítico, especialmente se a concentração do agente antiespumante for alta o suficiente (SUKAN *et al.*, 1984).

Desta forma, como o efeito antiespumante de um agente depende também dos microrganismos, da composição do meio e das condições operacionais, testes empíricos de diferentes agentes são necessários para avaliar sua adequação a uma aplicação específica.

3.6. PREPARADO ENZIMÁTICO PARA CONTROLE DE ESPUMA NA FERMENTAÇÃO

Embora o uso de agentes químicos (antiespumantes e dispersantes) ofereça vantagens como simplicidade, facilidade de operação e economia em alguns casos, também há desvantagens, como por exemplo, elevados custos de dosagem devido à sua ineficiência na contenção de espuma, derramamentos de fluidos do processo fermentativo causando perdas financeiras. Além disso, o uso dos agentes antiespumante e dispersante prejudicam o processo fermentativo e induzem respostas de estresse nas células das leveduras (NIELSEN *et al.*, 2017).

A maioria dos métodos mecânicos eficientes consome muita energia e não oferecem facilidade de operação. Já os dispositivos mecânicos mais simples não são eficientes o suficiente para serem

usados de forma individual. Assim, um único método pode não ser eficaz o suficiente para resolver o problema da formação de espuma. Assim, a ação combinada de mais de um método pode ser necessária. Por exemplo, o novo método de contenção de espuma que compreende o uso de preparado enzimático, da classe proteases, as quais clivam as ligações do tipo peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e eliminam o material depositado nas lamelas favorecendo o controle de bolhas.

O preparado enzimático (Fermax TM) tem potencial de controle de formação de espuma durante o processo de produção de bioetanol de caldo de cana-de-açúcar, ao mesmo tempo em que oferece controle e substitui produtos químicos, sendo uma solução biológica que impede a formação de espuma durante o processo de fermentação (NOVOZYMES, 2020).

Ao contrário dos produtos antiespumantes tradicionais, o Fermax TM não elimina a espuma, mas impede que ela se forme, pois altera a estrutura da espuma clivando as ligações do tipo peptídica das proteínas estabilizadoras tornando-a mais leve e menos densa. Isso permite um controle da formação de espuma no processo fermentativo, o que permite aos produtores operar suas plantas com maior eficiência. O Fermax TM pode substituir completamente ou ser utilizado em combinação com produtos químicos dispersantes tradicionais para aumentar sua atividade. Também pode diminuir o consumo em até 70% dos produtos tradicionais (antiespumantes e dispersantes) (NOVOZYMES, 2020).

Segundo Daniel Albuquerque Cardinali (chefe da Plataforma de Cana-de-Açúcar e Biorefino da Novozymes da América Latina, 2017), “o Fermax TM é uma solução muito econômica, competitiva com produtos químicos não agressivos, mas sem todos os custos ocultos, incluindo problemas de suprimento, danos ao fermento e incrustação”.

Essa alternativa enzimática pode ser facilmente aplicável em uma variedade de configurações de plantas, ou seja, processo fermentativo operada em modo batelada, batelada alimentado e contínuo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO DE ENSAIOS DE ADIÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO EM PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

O desenvolvimento do projeto foi realizado "in loco" no processo fermentativo em unidade industrial sucroenergética no interior do estado de São Paulo. O projeto foi desenvolvido em duas etapas, a primeira etapa no ano de 2018 (ensaio 1) e a segunda etapa no ano de 2019 (ensaio 2), sendo apresentado na Figura 5.

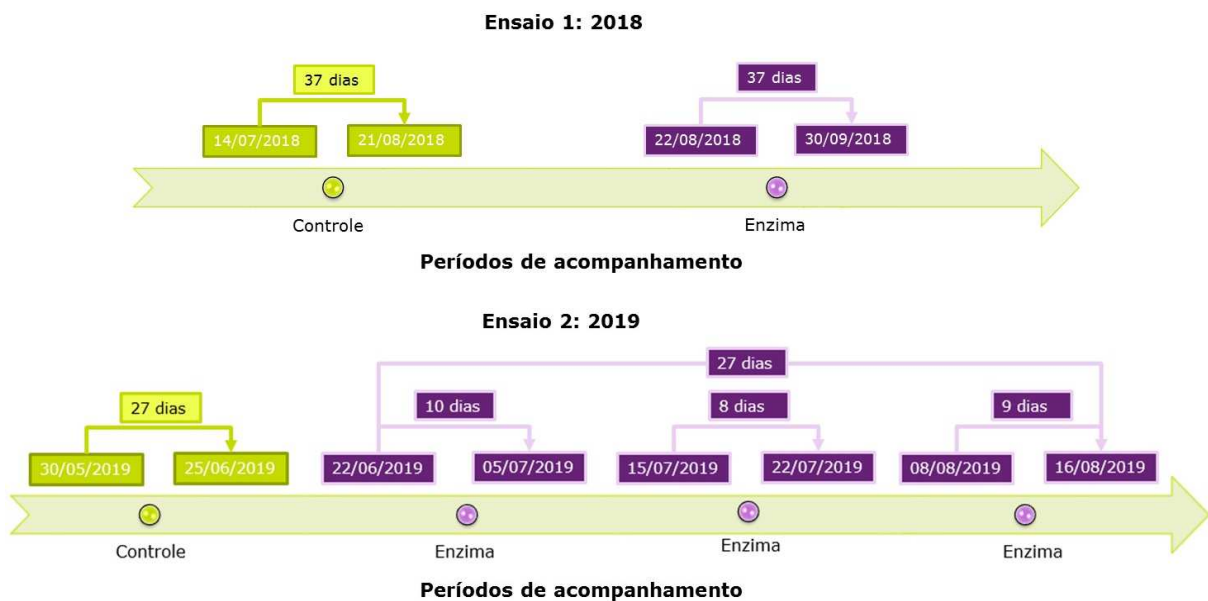


Figura 5. Delineamento dos ensaios de adição de preparado enzimático em processo industrial de produção de etanol. **Fonte:** próprio autor.

Ambos os ensaios foram divididos em dois períodos, como se segue: período "controle", o qual foi adicionado ao processo fermentativo somente os químicos antiespumante e dispersante e o

período “enzima”, o qual foi adicionado o preparado enzimático (Fermax TM), além de antiespumante e dispersante. No ensaio 1 o tempo de aplicação do preparado enzimático e do controle foram de 37 dias em cada período, enquanto no ensaio 2 foi de 27 dias em cada período (Figura 5).

4.2. ESTRUTURA DO COMPLEXO DO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

O parque de fermentação da unidade em questão possui um total de 8 dornas (biorreatores) operadas em modo batelada alimentada, constituídas de chapa de aço carbono em formato cilíndrico, conforme apresentado na Figura 6.



Figura 6. Dornas de fermentação do processo industrial de produção de bioetanol. **Fonte:** próprio autor.

As presentes dornas são dispostas no parque de fermentação conforme apresentado no “layout” da Figura 7.

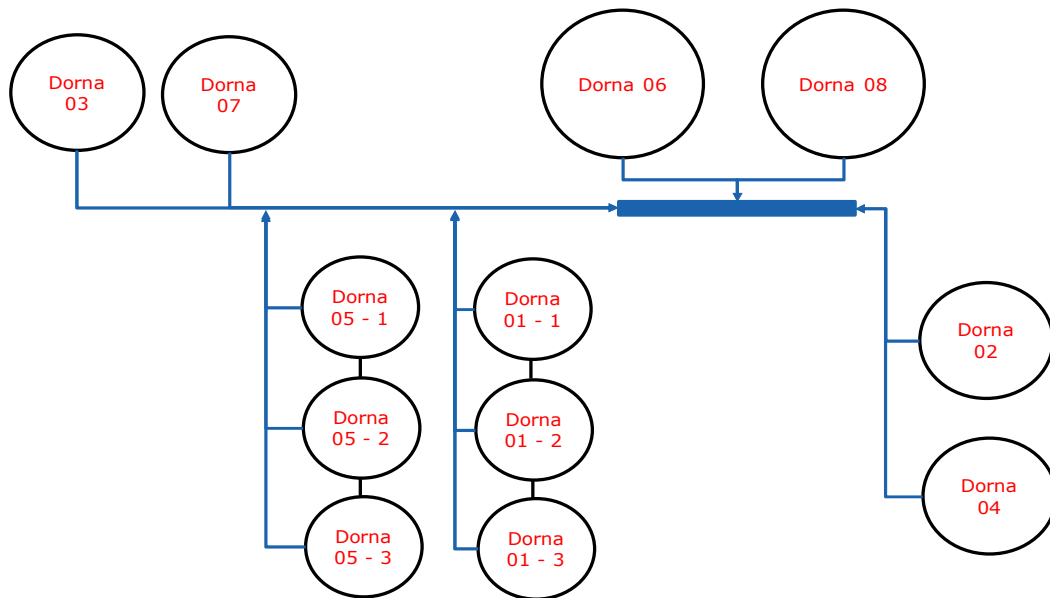


Figura 7. *Layout* do parque de fermentação. Dorna 01 e 05: conjunto interligado de 3 tanques para formar uma dorna, possuindo capacidade 1.050 m^3 (dorna 1) e 1.050 m^3 (dorna 05); Dorna 02, 03, 04 e 07: tanque único, possuindo capacidade volumétrica de 1.000 m^3 cada dorna; Dorna 06 e 08: conjunto único, possuindo capacidade volumétrica de 2.100 m^3 cada dorna. **Fonte:** próprio autor.

Para o resfriamento do fluido em processo de fermentação (também denominado de vinho levedurado ou levedura + mosto), cada dorna possui um sistema de bombeamento interligado ao seu fundo cônico, direcionando o fluido para o trocador de calor de placas, conforme apresentado na Figura 8. Assim, o fluido em processo de fermentação é bombeado para as placas do trocador de calor (sendo resfriado por recepção de água industrial a 30°C), retornando para dorna com temperatura de aproximadamente 32°C .

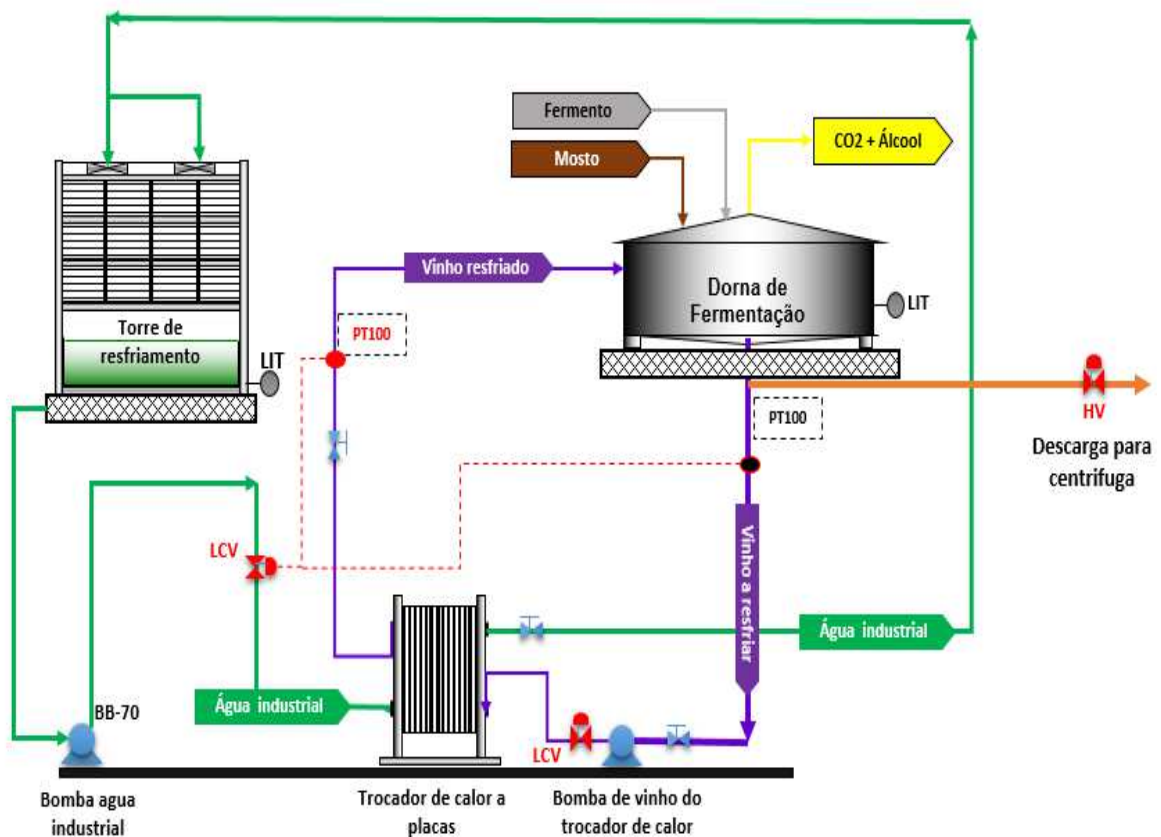


Figura 8. Trocador de calor das dornas de fermentação do processo industrial de produção de bioetanol. **Fonte:** próprio autor.

O produto final da fermentação é encaminhado para as centrífugas de fermento (com capacidade de separação total de aproximadamente: $800 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). O processo é munido de duas centrífugas (Alfa Laval 512) e seis centrífugas (Alfa Laval 712). A separação do produto final de fermentação é realizada no rotor da centrífuga nas boquilhas de descarga, conforme apresentado pela Figura 9. Desta forma, o vinho é deslocado para o centro do rotor, de onde é retirado, e o fermento é deslocado para fora do rotor por meio de boquilhas de descarga.

processo, a ilustração dos tanques é apresentada na Figura 10. Assim, um centímetro na régua graduada equivale a 2,96 Kg de antiespumante. O recipiente foi mensurado em períodos de 1 h e ao final de 24 h de produção foi realizado o fechamento de consumo de antiespumante (em quilogramas) e anotado no formulário de processo para inserção do relatório gerencial de insumos.



Figura 10. Tanques de antiespumante. **Fonte:** próprio autor.

No recipiente de dosagem existe uma bomba de deslocamento positivo com capacidade de 500 L.h^{-1} que pressuriza a rede de antiespumante das oito dornas, sendo que em cada dorna de fermentação possui uma sonda capacitiva instalada em seu topo, onde a espuma ao tocar na sonda envia um sinal ao CLP (“Controlador lógico programável”) que faz o acionamento automático da válvula de dosagem, o acionamento é realizado através de uma bobina solenoide, deixando-a aberta por 5 s, sendo o seu ponto de dosagem a dorna de fermentação, bombeando o antiespumante no interior do equipamento. A Figura 11 apresenta a estrutura de dosagem de antiespumante utilizada no processo.



Figura 11. Estrutura de dosagem de antiespumante. **Fonte:** próprio autor.

Uma válvula de alívio tem a função de aliviar a pressão da rede de antiespumante. Assim, quando a pressão atingi 5 kgf.cm^{-2} o produto que está na rede pressurizada é devolvido ao recipiente de antiespumante. Durante o período do ensaio 1 (2018) foi aplicado ao processo um total de 30.760 Kg de antiespumante (Despumol 7735, Solenis). Já durante o período do ensaio 2 (2019) foi aplicado um total de 29.700 Kg de antiespumante (Serquímica).

4.4. ESTRUTURA DE DOSAGEM DE DISPERSANTE

A estrutura atual é composta por dois tanques confeccionados, respectivamente, com os seguintes materiais: aço carbono e inox. O tanque maior é utilizado como estoque de dispersante e tem

capacidade mássica de aproximadamente 4.100 Kg e o tanque menor é utilizado como medidor de dosagem com capacidade de 85 Kg. O tanque medidor possui uma régua graduada onde são realizadas as medições para quantificação dos insumos do processo, conforme apresentado na Figura 12.



Figura 12. Tanques de Dispersante. **Fonte:** próprio autor.

O valor de 1 cm na régua graduada equivale a 1,23 Kg de dispersante. O recipiente foi mensurado a cada 1 h e ao final de 24 h de produção foi realizado o fechamento de consumo de dispersante em quilos e anotado no formulário de processo para inserção do relatório gerencial de insumos.

Para bombear o fluido ao tanque medidor de dosagem foi utilizada uma bomba de deslocamento positivo (Weatherford, modelo HD15A) com capacidade de 200 L.h⁻¹. Na parte inferior do tanque medidor de dosagem existe instalado um pistão automático, sendo o seu ponto de dosagem: a saída de fermento previamente tratado das cubas, o início da dosagem foi realizado de forma

automática pelo CLP, no início do ciclo de bombeamento de fermento para as dornas. Para realizar a dosagem desejada foi criado na tela de supervisor o campo “nº de injeções”, para que o pistão injetasse o que foi previamente programado, o pistão fica aberto para carregamento de dispersante por 60 s enchendo aproximadamente 600 mL e ao receber o sinal elétrico do CLP na bobina solenoide, injeta o dispersante na linha de bombeamento de fermento por 60 s, o CLP repete a sequência até totalizar o número de injeções previamente programadas. A Figura 13 apresenta a estrutura de dosagem de dispersante utilizada no processo.

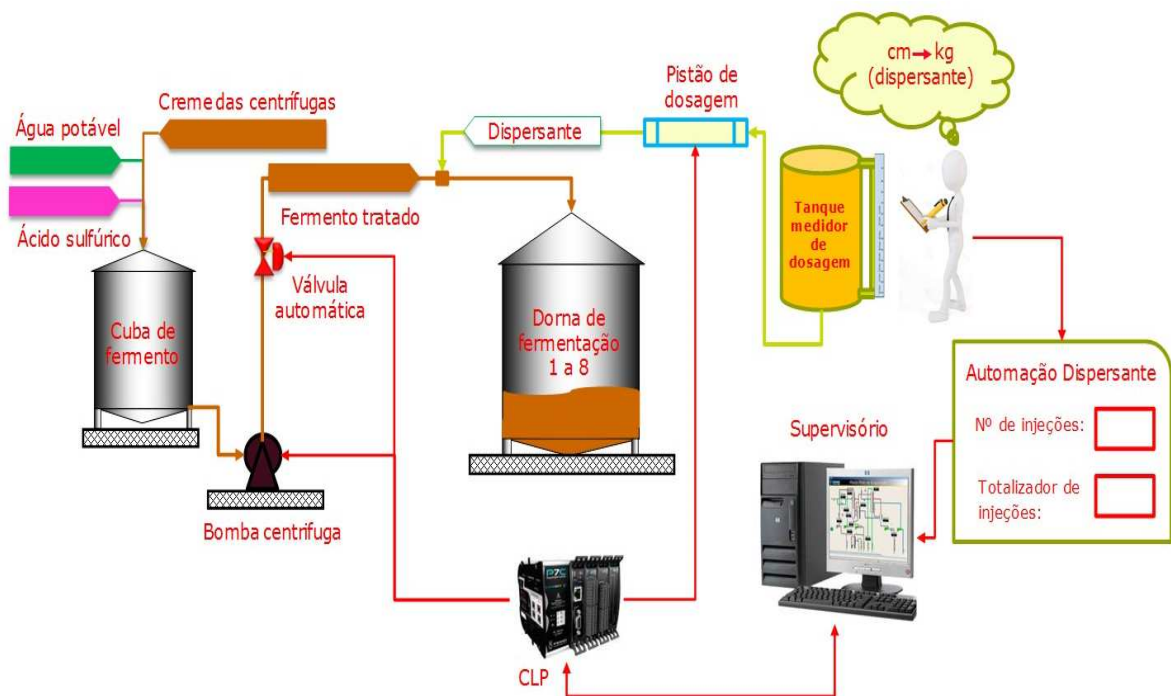


Figura 13. Estrutura de dosagem de dispersante. **Fonte:** próprio autor.

Durante o período do ensaio 1 (2018) foi aplicado ao processo um total de 9.000 Kg de dispersante (Prevac Ga 740, Solenis). Já

durante o período do ensaio 2 (2019) foi aplicado um total de 12.245 Kg de antiespumante (Serquímica).

4.5. ESTRUTURA DE DOSAGEM DE PREPARADO ENZIMÁTICO

O preparado enzimático comercial aplicado ao processo industrial de produção de bioetanol foi a Fermax-TM (Novozymes). A estrutura de dosagem do preparado enzimático foi conduzida de duas formas distintas, como se segue: ensaio 1, em modo contínuo no tanque de diluição de fermento tratado; ensaio 2 conduzida em modo batelada, após o envio do fermento as dornas de fermentação. As subseções seguintes detalham as estruturas de dosagem do preparado enzimático e seu funcionamento nos dois ensaios realizados.

4.5.1. ESTRUTURA DE APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO (ENSAIO 1)

A estrutura de dosagem do preparado enzimático foi composta por um container contendo 1.100 kg de preparado enzimático, o presente container é munido de uma régua graduada para proceder às mensurações do insumo do processo, conforme apresentado na Figura 14. Desta forma, 1 cm da régua graduada equivalem a 13,2 Kg, o container foi mensurado a cada 1 h e ao final de 24 h de produção foi realizado o fechamento de consumo de preparado enzimático em quilos e anotado no formulário de processo para inserção do relatório gerencial de insumos.

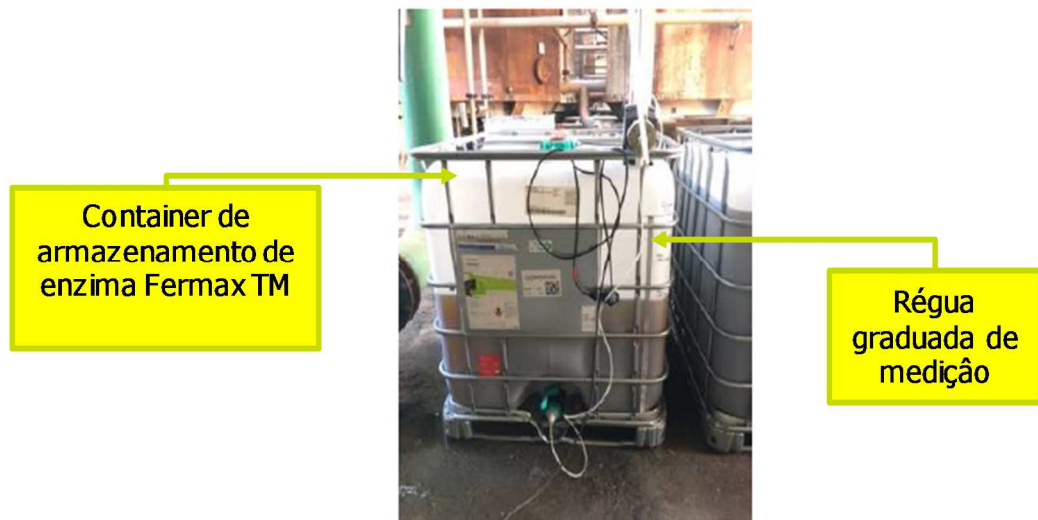


Figura 14. Representação de container de dosagem de preparado enzimático Fermax-TM (Novozymes). **Fonte:** próprio autor.

Para bombear o fluido a cuba de diluição de fermento concentrado foi utilizada uma bomba dosadora (ProMinent, modelo Gamma L, com capacidade entre $0,7-9 \text{ L.h}^{-1}$). O ponto de dosagem do preparado enzimático foi na escotilha superior da cuba de diluição de fermento tratado, a dosagem foi conduzida em modo contínuo durante todo o período de aplicação do produto. Para realizar a dosagem pré-estabelecida o suporte de aplicação possui um ajuste da chave seletora rotativa da bomba de dosagem. A Figura 15 apresenta a estrutura de dosagem do preparado enzimático no ensaio 1.

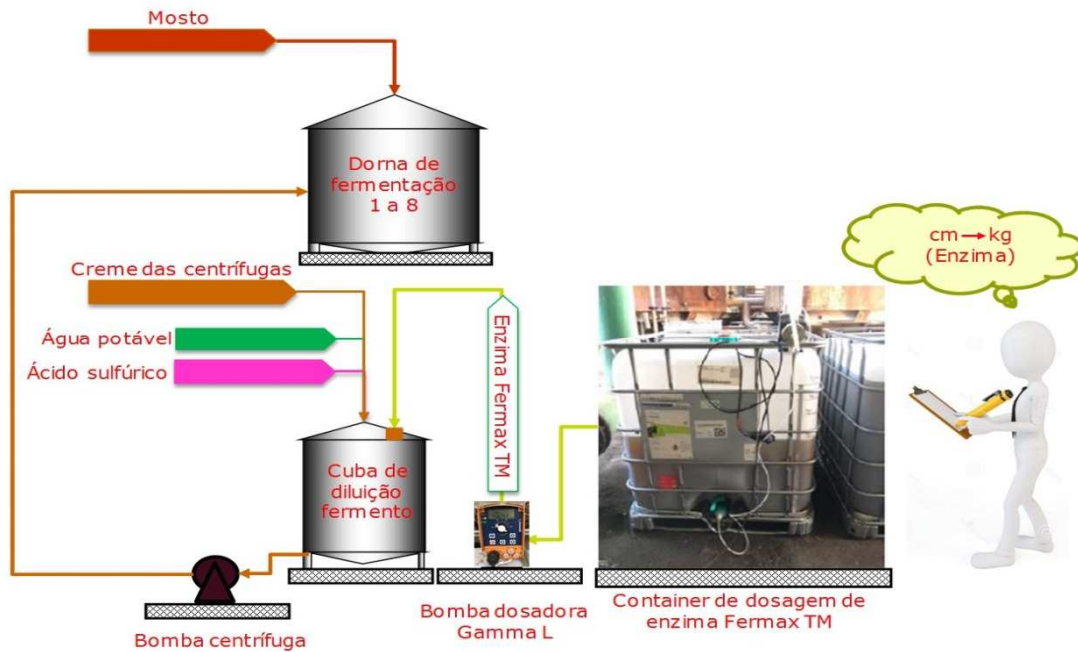


Figura 15. Estrutura de dosagem de preparado enzimático Fermax-TM (Novozymes), ensaio 1. **Fonte:** próprio autor.

Durante o período do ensaio 1 foi aplicado ao processo 3.300 Kg de preparado enzimático.

4.5.2. ESTRUTURA DE APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO (ENSAIO 2)

A estrutura de dosagem de preparado enzimático foi composta pelo mesmo container descrito anteriormente (item 4.5.1), conforme apresentado na Figura 14. Neste caso, o container continha também 1.100 kg de preparado enzimático, sendo o recipiente medido da mesma forma do item anterior (4.5.1).

Para bombear o fluido na saída da cuba de tratamento de fermento foi utilizada a mesma bomba dosadora do item anterior (4.5.1). Entretanto, neste caso o ponto de dosagem do preparado enzimático foi na saída de fermento tratado das cubas. Assim, o

início da dosagem foi realizado de forma automática pelo CLP, concomitante ao início do ciclo de bombeamento de fermento para as dornas. A bomba dosadora foi acionada todas as vezes em que se realizou o bombeamento de fermento para as dornas, para o acionamento, a bomba recebeu um sinal elétrico de 4-20 mA do CLP, dosando, assim, a quantidade de preparado enzimático na linha de bombeamento de fermento por 10 min. Para realizar a dosagem desejada o suporte de aplicação foi ajustado no “display” da bomba. A Figura 16 apresenta a estrutura de dosagem de preparado enzimático do ensaio 2.

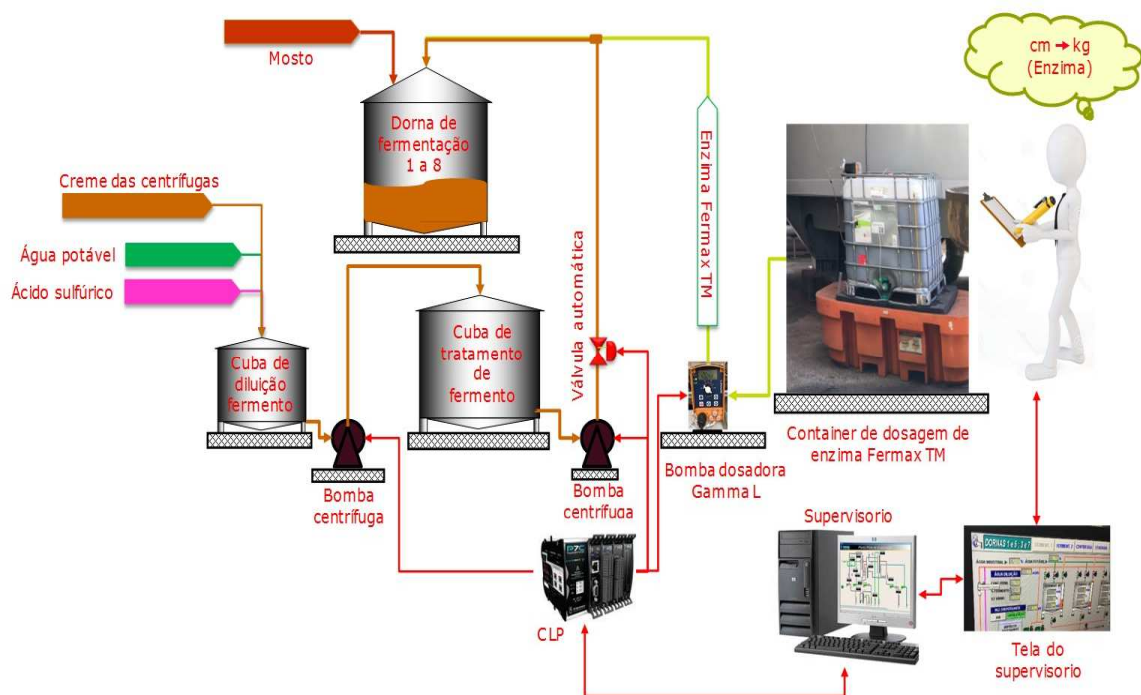


Figura 16. Estrutura de dosagem de preparado enzimático Fermax-TM (Novozymes), ensaio 2. **Fonte:** próprio autor.

Durante o período do ensaio 2 foi aplicado ao processo 2.200 Kg de preparado enzimático.

4.6. AMOSTRAGEM NO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

4.6.1. MOSTO

A coleta de mosto da fermentação foi realizada por amostragem contínua, conforme apresentado na Figura 17. A cada 5 min a válvula automática de coleta foi aberta (intervalo de 5 segundos para proceder à coleta da amostra, sendo em seguida fechada automaticamente), o fluido coletado foi 15 mL, sendo armazenado em um frasco plástico na geladeira a 5 °C. A cada 4 h a amostra armazenada foi enviada ao laboratório pelo analista para a determinação dos açúcares, conforme a Tabela 3.

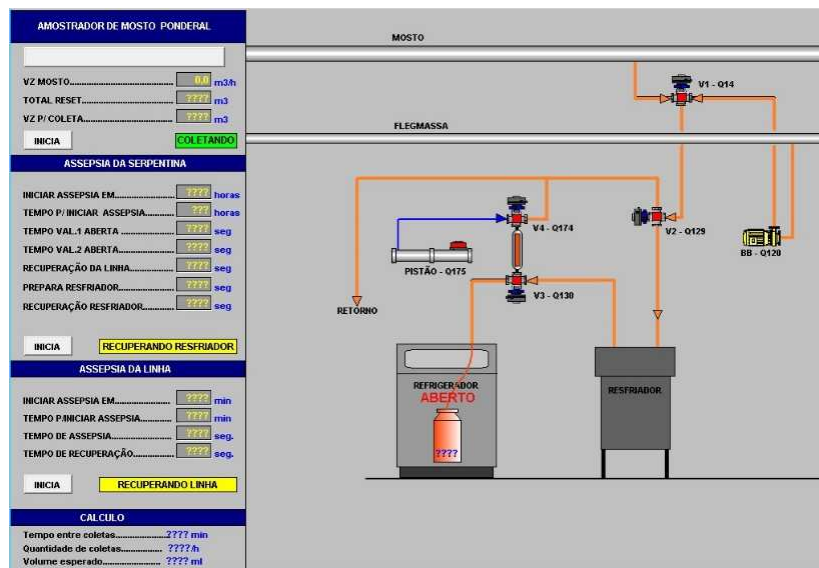


Figura 17. Sistema de amostragem de mosto. Fonte: próprio autor.

4.6.2. VINHO LEVEDURADO

A coleta de vinho levedurado foi realizada por amostragem contínua, conforme apresentado na Figura 18. A cada 5 min a válvula automática de coleta foi aberta automaticamente coletando a amostra (ficando aberta por 5 s), o fluido coletado 15 mL, foi armazenado em um frasco plástico e estocado em geladeira a 5 °C. A cada 4 h a amostra de vinho fermentada foi coletada do frasco e enviada ao laboratório pelo analista para a determinação dos açúcares residuais, teor alcoólico, nível de contaminação, além do nível de floculação e viabilidade da levedura, conforme a Tabela 3.



Figura 18. Sistema de amostragem contínua do vinho. **Fonte:** próprio autor.

4.6.3. FERMENTO TRATADO

A coleta de fermento tratado foi realizada por amostragem pontual, o ponto de coleta trata-se de uma tubulação de entrada de fermento das cubas, conforme apresentado na Figura 19. O fluido coletado foi 250 mL, sendo enviado para o laboratório a cada 2 h,

e então foram determinados o pH, o teor alcoólico e o teor de levedura, conforme a Tabela 3.

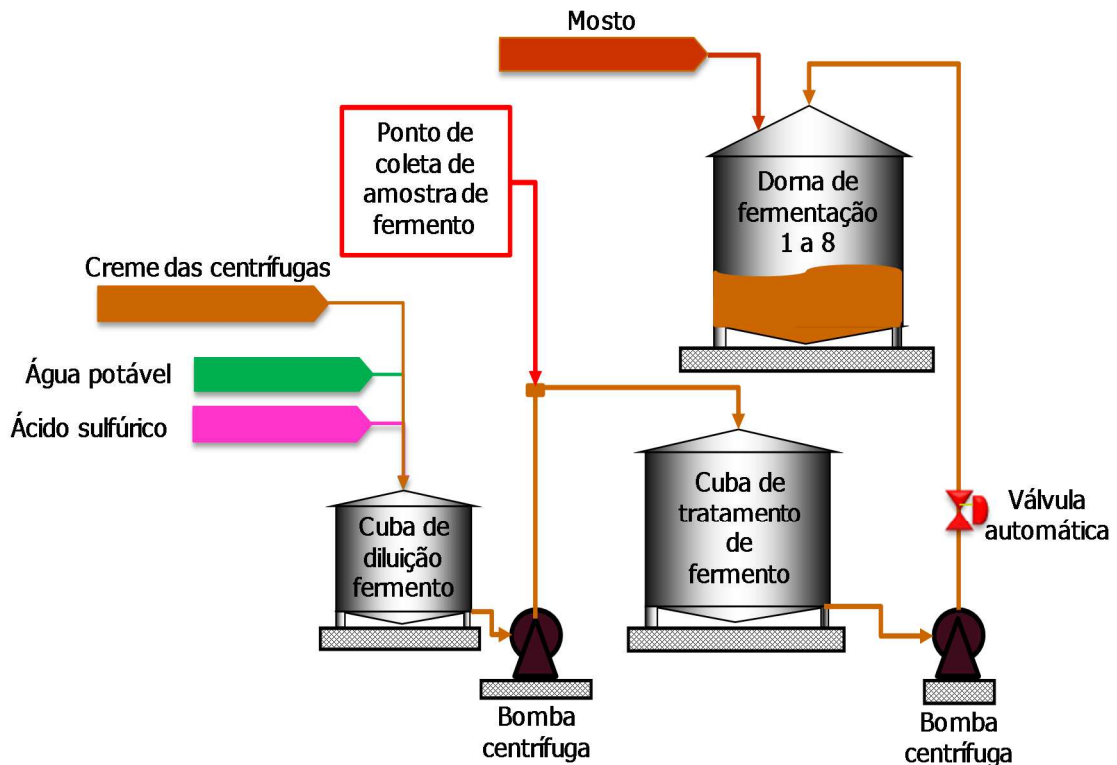


Figura 19. Ponto de coleta de amostra do fermento tratado. **Fonte:** próprio autor.

4.7. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

As análises físico-químicas e microbiológicas foram executadas no laboratório da área de fermentação da empresa, conforme manual de métodos de análises da fermentação. A Tabela 3 resume todos os métodos analíticos realizados durante os ensaios no processo. O Apêndice A descreve em detalhes a metodologia de cada procedimento analítico descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Procedimentos analíticos realizados durante as amostragens do processo industrial de produção de bioetanol.

Amostras	Tipo de análise	Métodos analíticos
Mosto	Açúcares Teor de impurezas	Cromatografia Líquida (CLAE) Centrifugação
Vinho levedurado	Teor de etanol Nível de contaminação Nível de floculação Viabilidade celular	Densímetro digital Microscopia óptica Observação em proveta Microscopia óptica
Fermento tratado	Teor de levedo pH	Centrifugação pHmetro digital

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de Tukey foram realizados, usando o software JMP 15 (versão demo), para verificação de diferenças significativas dos resultados de cada ensaio realizado. Para conclusões estatísticas, foi considerado um nível de significância (α) de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção serão apresentados os resultados e discussão referentes a 2 ensaios realizados nos anos de 2018 e 2019, no qual foi realizada a dosagem de produtos redutores de espuma em processo industrial de produção de bioetanol. Os parâmetros avaliados referem-se ao consumo dos produtos químicos (antiespumante, dispersante e preparado enzimático), além das análises físico-químicas e microbiológicas dos fluidos envolvidos no bioprocessamento, como por exemplo, o mosto, o vinho e o fermento tratado.

Nos períodos controle de ambos os ensaios 1 e 2 foram adicionados ao processo fermentativo somente produtos químicos (antiespumante e dispersante) e nos períodos enzima produtos químicos (antiespumante e dispersante) concomitante com o preparado enzimático.

Tanto o período controle quanto enzima, os dados experimentais obtidos foram analisados empregando o teste estatístico de *Tukey* para verificar se a presença do preparado enzimático realmente contribuiu para o controle da formação de excesso de espuma no processo de produção industrial de bioetanol. O teste de *Tukey* é aplicado sobre repetições experimentais nas quais as condições são fielmente reproduzidas em replicatas, no entanto, decidiu-se aplicá-las em todas as análises, pois os testes em escala industrial ocorreram computando

resultados de vários dias de aplicação do preparado enzimático e entendeu-se que seria a ferramenta mais adequada para este caso.

5.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO NO CONTROLE DE FORMAÇÃO DE ESPUMA EM PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Os principais insumos aplicados em processo industrial de produção de bioetanol que visam combater à formação de excesso de espuma são os antiespumantes e dispersantes. Além disso, preparados enzimáticos também vêm sendo avaliados em várias empresas do setor nos últimos 4 anos.

A Figura 20 (ensaios 1 e 2, respectivamente) apresenta a relação de consumo de antiespumante/volume de etanol produzido, ($R_{a/e}$) em função do período de tempo do processo. O consumo total de antiespumante foi relacionado ao teor de etanol produzido no mesmo período, normalizando os dados, a fim de que esses pudessem ser comparados, pois o consumo de antiespumante é diretamente proporcional à produção de etanol.

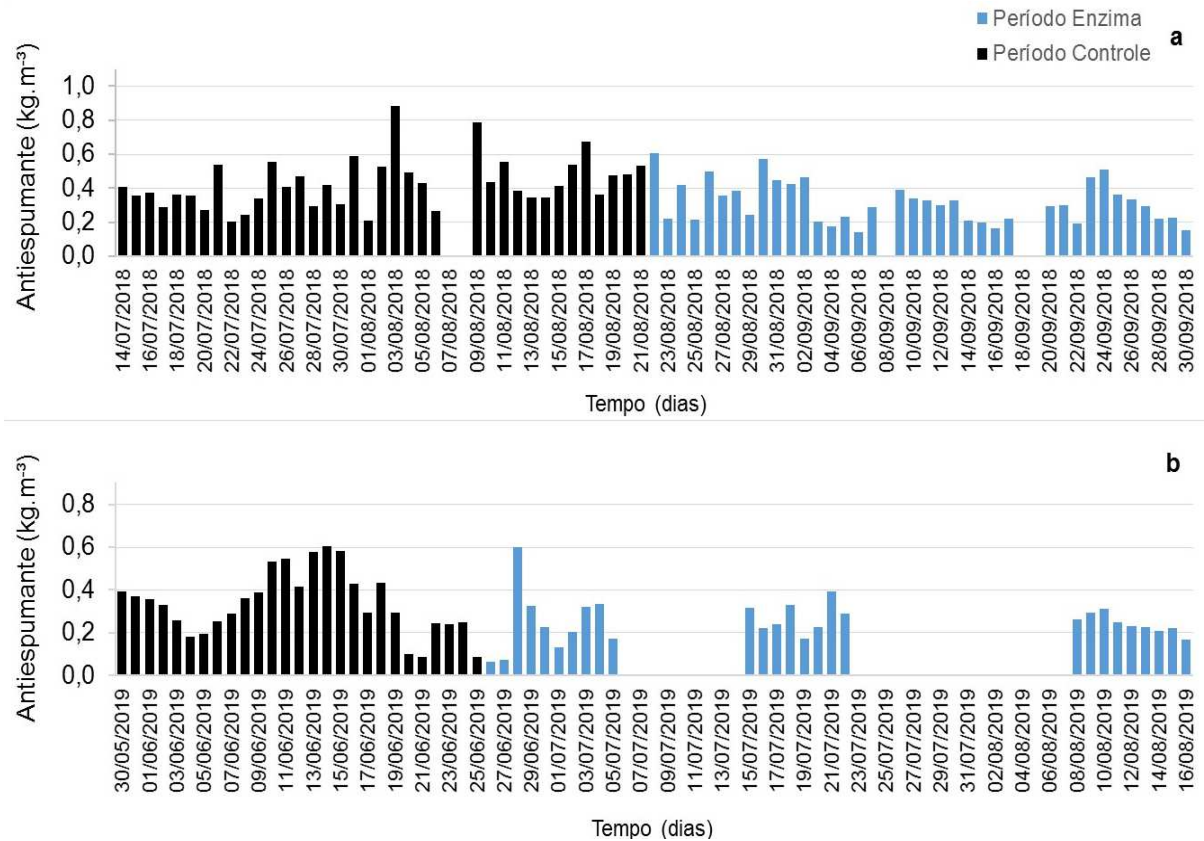


Figura 20. Consumo de antiespumante em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de antiespumante por metro cúbico de etanol produzido = $R_{a/e}$). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.

Os resultados mostraram variação nos valores da $R_{a/e}$, em função do tempo do processo e do período de aplicação do preparado enzimático. Assim, considerando o período do ensaio 1, a $R_{a/e}$ foi maior no período controle ($0,430 \text{ kg.m}^{-3}$) quando comparado ao período enzima ($0,316 \text{ kg.m}^{-3}$), ou seja, redução de 27% na dosagem de antiespumante na presença de preparado enzimático (Tabela 4). No ensaio 2 a $R_{a/e}$ foi também maior no período controle ($0,336 \text{ kg.m}^{-3}$) quando comparado ao período enzima ($0,253 \text{ kg.m}^{-3}$), ou seja, redução de 25% na $R_{a/e}$. Todavia, a $R_{a/e}$ no período controle do ensaio 1 ($0,430 \text{ kg.m}^{-3}$) foi maior do que a do ensaio 2 ($0,336 \text{ kg.m}^{-3}$), ou seja, redução de 22% na dosagem

de antiespumante, sendo essa variação considerada normal em processo industrial de produção de bioetanol. Todavia, os resultados de consumo da $R_{a/e}$ em função da aplicação do preparado enzimático foram semelhantes entre os ensaios 1 e 2 (Figura 20 e Tabela 4).

Tabela 4. Consumo de antiespumante, dispersante e preparado enzimático em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de insumo por metro cúbico de etanol produzido, $R_{a/e}$, $R_{d/e}$ e $R_{e/e}$, respetivamente).

Antiespumante $R_{a/e}$	Controle ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Enzima ($\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Diferença (%)
Ensaio 1	0,430 \pm 0,15 ^a	0,316 \pm 0,12 ^b	27
Ensaio 2	0,336 \pm 0,15 ^a	0,253 \pm 0,11 ^b	25
Dispersante $R_{d/e}$			
Ensaio 1	0,170 \pm 0,03 ^a	0,071 \pm 0,04 ^b	58
Ensaio 2	0,155 \pm 0,04 ^a	0,097 \pm 0,03 ^b	37
Preparado enzimático $R_{e/e}$			
Ensaio 1	*	0,091 \pm 0,03	100
Ensaio 2	-	0,093 \pm 0,04	100

*Ensaio 1 e 2 = testes realizados na Usina A em 2018 e 2019, respetivamente. (a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística. * - não dosado.*

É possível confirmar através do uso da ferramenta estatística (teste de *Tukey*) que os resultados da $R_{a/e}$ obtidos antes e após a aplicação do preparado enzimático são distintos, portanto, houve diferença significativa entre os períodos controle e enzima em ambos os ensaios avaliados. A informação de letras distintas entre os períodos controle e enzima confirmam a diferença estatística entre os resultados (Tabela 4). O Apêndice B apresenta os resultados detalhados da aplicação dos testes de *Tukey* de cada parâmetro avaliado na Tabela 4.

A Figura 21 apresenta a relação de consumo de dispersante/volume de etanol produzido, ($R_{d/e}$) em função do tempo do processo industrial de bioetanol.

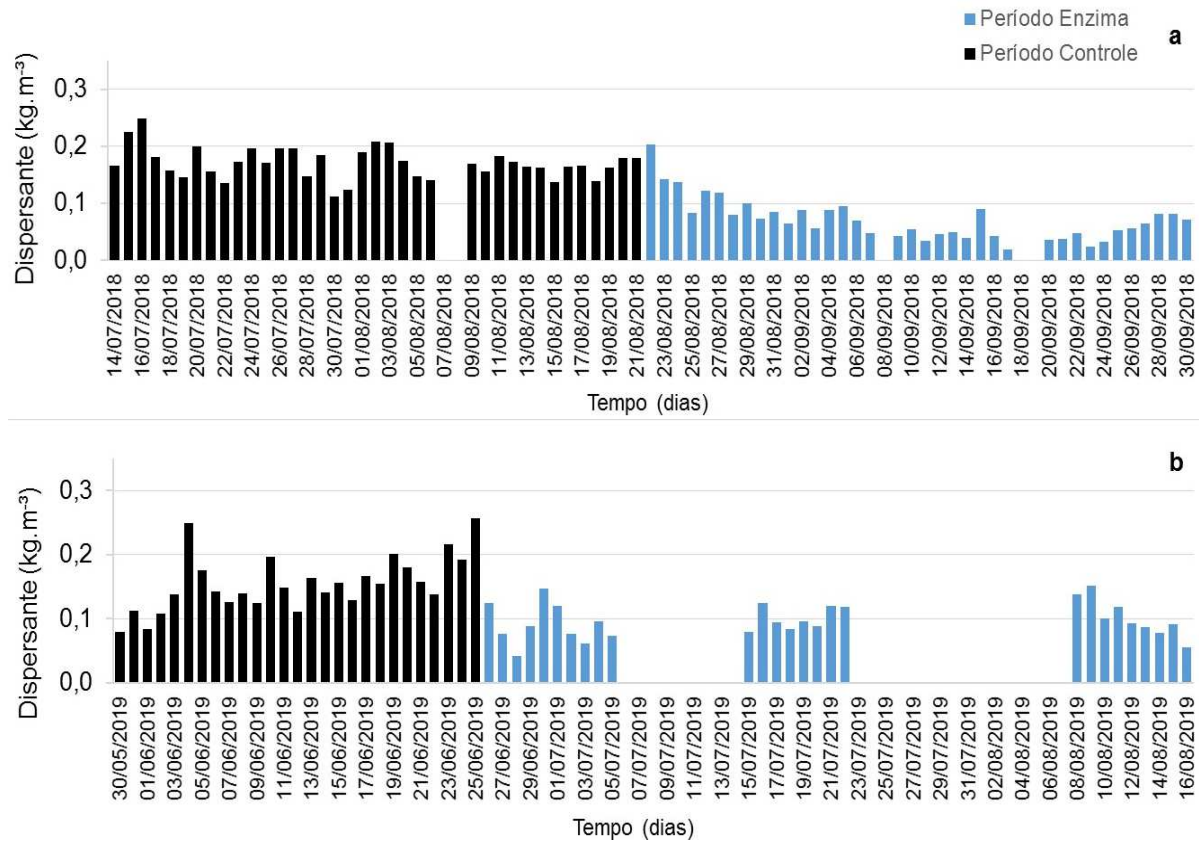


Figura 21. Consumo de dispersante em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de dispersante por metro cúbico de etanol produzido, $R_{d/e}$). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.

Os resultados indicam variação no consumo da $R_{d/e}$ ao longo do tempo do processo industrial de bioetanol (Figura 21 e Tabela 4). Considerando todo o período do ensaio 1, a $R_{d/e}$ foi maior no período controle ($0,170 \text{ kg.m}^{-3}$) quando comparada ao período enzima ($0,071 \text{ kg.m}^{-3}$), ou seja, redução de 58% no consumo de dispersante na presença do preparado enzimático. O ensaio 2 também apresentou uma $R_{d/e}$ maior no período controle ($0,155 \text{ kg.m}^{-3}$)

³) quando comparado ao período enzima ($0,097 \text{ kg.m}^{-3}$), ou seja, redução de 37% do consumo de dispersante.

Também é possível confirmar que os resultados do consumo de dispersante nos períodos controle e enzima são distintos (teste de *Tukey*), portanto, houve diferença significativa quando o preparado enzimático foi aplicado ao processo em ambos os ensaios (Tabela 4, Apêndice B).

A Figura 22 apresenta a relação do consumo de preparado enzimático/volume de etanol produzido ($R_{e/e}$) ao longo do tempo do processo industrial de bioetanol (ensaios 1 e 2). No caso do ensaio 1 o preparado enzimático não foi aplicado nos períodos de 14/07/2018 a 21/08/2019, enquanto o ensaio 2 nos períodos de 30/05/2019 a 25/06/2019, pois a estratégia foi medir o consumo de antiespumante e dispersante sem à aplicação do preparado enzimático, sendo esse período denominado de período controle. O preparado enzimático foi aplicado apenas no período enzima, neste período foi mensurado o consumo de antiespumante, dispersante e do próprio preparado enzimático.

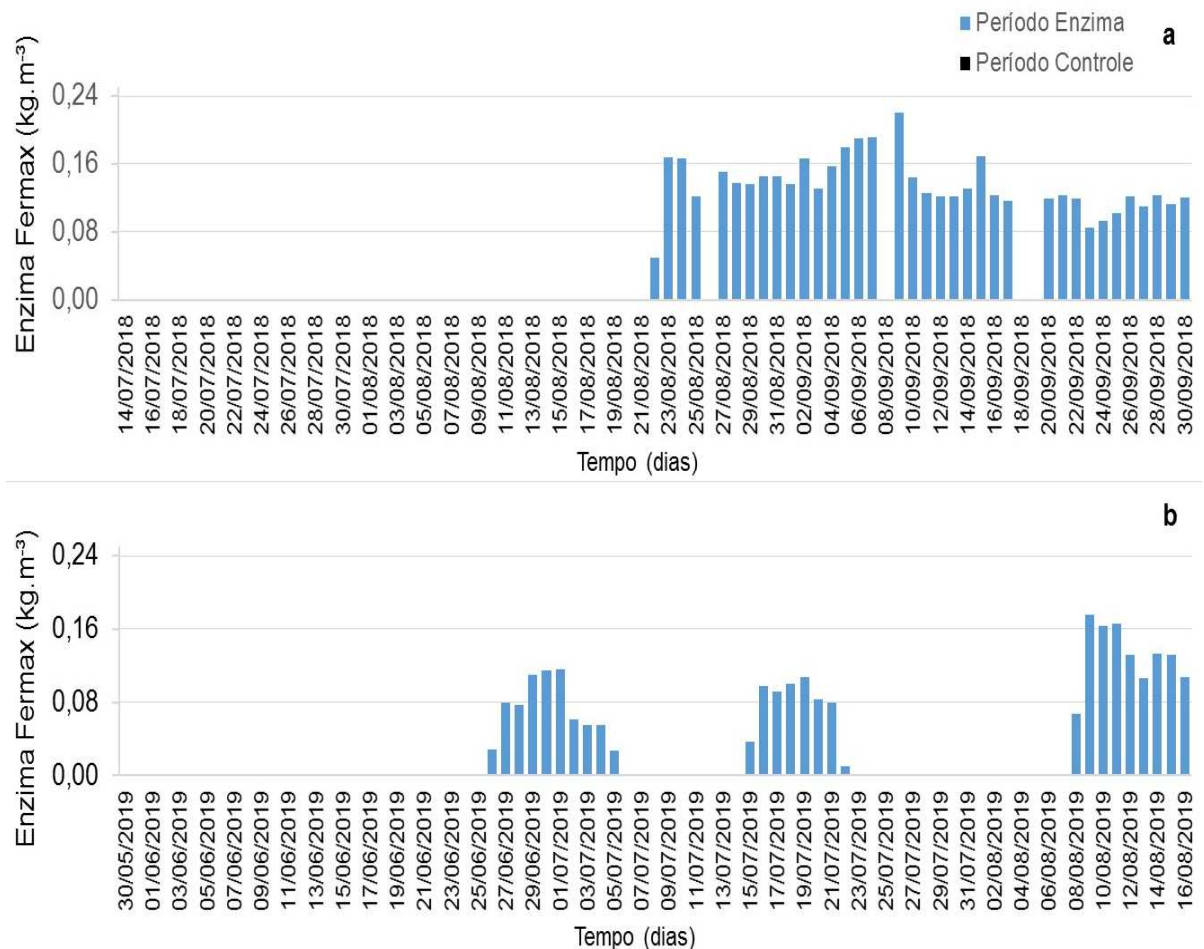


Figura 22. Consumo de preparado enzimático em processo industrial de produção de bioetanol (relação de quilograma de preparado enzimático por metro cúbico de etanol, $R_{e/e}$). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.

Os resultados mostram variação da $R_{e/e}$ ao longo do tempo do processo industrial de bioetanol. Entretanto, considerando a média de todos os períodos (ensaios 1 e 2), as $R_{e/e}$ foram semelhantes entre os dois ensaios, resultando em médias de $0,091 \text{ kg.m}^{-3}$ e $0,093 \text{ kg.m}^{-3}$, respectivamente (Tabela 4).

O aspecto visual do processo industrial de bioetanol também foi avaliado (Figura 23). Assim, houve redução na formação de espuma nas cubas de fermento tratado no período enzima quando comparado ao período controle (em ambos os ensaios avaliados)

contribuindo com a diminuição de consumo de antiespumante e dispersantes apresentados anteriormente (Figuras 20, 21 e Tabela 4).



Figura 23. Aspecto visual da formação de espuma nas cubas de fermento tratado em processo industrial de produção de bioetanol. (ac) Período Controle, sem preparado enzimático. (bd) Período Enzima, com preparado enzimático. (ab) Ensaio 1. (cd) Ensaio 2. **Fonte:** Autor próprio.

Os resultados obtidos no presente trabalho (Usina A) foram comparados com os resultados de aplicação do mesmo preparado enzimático em processo industrial de produção de bioetanol da Usina B (NOVOZYMES, 2020). A aplicação do preparado enzimático foi

semelhante ao presente estudo, ou seja, foi utilizado o ponto de saída das cubas de fermento para introdução do preparado enzimático ao processo (ensaio 2 da Usina A e no ensaio 3 da Usina B), com exceção do ensaio 1 (Usina A) o qual preparado enzimático foi aplicado diretamente no tanque de tratamento do fermento. No teste realizado na Usina B o período de acompanhamento de aplicação do preparado enzimático foi de 70 dias e o período controle de 72 dias.

O ensaio da Usina B apresentou uma redução nos valores da $R_{a/e}$ e da $R_{d/e}$ em processo industrial de produção de bioetanol, sendo os resultados semelhantes aos obtidos nos testes do presente estudo (Usina A), à exceção na Usina B, foi na diferença percentual de 73% no consumo da $R_{d/e}$, enquanto os outros ensaios (1 e 2 da Usina A) mostraram um valor médio de consumo da $R_{d/e}$ de aproximadamente 45%. No entanto, a redução do consumo da $R_{d/e}$ na Usina B pode ser explicada em função da maior dosagem de preparado enzimático no presente teste ($0,187 \text{ kg.m}^{-3}$) quando comparado com a média dos ensaios 1 e 2 da Usina B ($0,092 \text{ kg.m}^{-3}$), ou seja, 50% superior. Além disso, saliente-se que a dosagem de preparado enzimático no ensaio da Usina B foi superior as dosagens realizadas na Usina A (ensaios 1 e 2).

5.2. AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE DESEMPENHO DO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO

Os principais indicadores de desempenho do processo fermentativo de produção de bioetanol foram monitorados ao longo do tempo dos ensaios 1 e 2 realizados nos anos de 2018 e 2019 respectivamente.

A Tabela 5 apresenta os resultados do monitoramento dos parâmetros de produção de bioetanol. Os valores apresentados são as médias dos resultados obtidos ao longo dos ensaios 1 e 2 em estudo. Assim, os resultados da Tabela 5 foram submetidos à análise do teste de *Tukey* considerando nível de significância (α) de 0,05 (Apêndice C). Os gráficos completos com todos os resultados de cada parâmetro em função do tempo dos ensaios em estudo são apresentados no Apêndice D.

Tabela 5. Monitoramento de indicadores de desempenho do processo fermentativo de produção de bioetanol.

Parâmetros	Ensaio 1			Ensaio 2		
	Controle	Enzima	Dif. (%)	Controle	Enzima	Dif. (%)
Contaminação no vinho ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	21,2 ^a	20,7 ^a	-2,4	34,8 ^a	38,3 ^a	+10,2
Viabilidade celular (%)	89,5 ^a	87,0 ^b	-2,7	90,1 ^a	89,0 ^a	-1,2
Floculação celular (%)	16,8 ^a	1,7 ^b	-89,5	13,5 ^a	16,3 ^a	+21,2
Dióxido de cloro ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)	0,41 ^a	0,53 ^b	+30,9	0,38 ^a	0,41 ^a	+10,1
Impureza do mosto (%)	0,14 ^a	0,12 ^b	-16,5	0,12 ^a	0,126 ^a	-0,3
Teor de levedo no vinho (%)	11,9 ^a	10,9 ^b	-8,1	12,1 ^a	11,8 ^a	-2,6
Teor alcoólico no vinho (%)	8,7 ^a	9,1 ^b	+4,8	9,0 ^a	9,2 ^a	+1,7
Temperatura do vinho ($^{\circ}\text{C}$)	34,9 ^a	34,5 ^b	-1,1	33,8 ^a	34,3 ^b	+1,5
pH levedo tratado	2,48 ^a	2,481 ^a	+0,1	2,38 ^a	2,40 ^a	+0,7
ART mosto (%)	18,6 ^a	19,4 ^b	+4,2	18,4 ^a	19,2 ^b	+4,2
Vazão de mosto ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)	333,2 ^a	247,0 ^b	-25,9	317,6 ^a	319,2 ^a	+0,5
Taxa de ocupação de dornas (%)	74,1 ^a	57,3 ^b	-22,7	59,8 ^a	58,8 ^a	-1,7
Produção de álcool a 100 % (m^3)	838,3 ^a	691,4 ^b	-17,5	860,4 ^a	868,3 ^a	+0,9
Mix de produção (% etanol)	43,1 ^a	35,7 ^b	-17,2	44,0 ^a	38,3 ^a	-12,9
Rendimento fermentativo (%)	90,1 ^a	90,13 ^a	+0,04	93,3 ^a	90,6 ^a	-2,9

(a) e (b) representam o Teste Tukey, valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística. ART = açúcares redutores totais. Dif (%) = diferença percentual.

Os resultados indicam que durante a aplicação do preparado enzimático (ensaio 1) o processo de produção de bioetanol resultou em média em uma diminuição de 89,5% no nível de floculação. Devido a esse problema foi aplicado uma dosagem extra de dióxido de cloro em (30,9%) com intuito de diminuir o nível de floculação, obtendo-se como consequência a redução da viabilidade celular em 2,7% (Tabela 5 e Apêndice C). Além disso, há indícios que o parâmetro de impureza de mosto (o qual foi em média 16,5% menor no período enzima) também foi fator relevante para provocar o aumento do nível de floculação (Tabela 5 e Apêndice C).

Também foi averiguado no ensaio 1 durante o período enzima uma redução de 17,2% no *mix* de produção, culminando em diminuição da vazão de mosto (25,9%), da produção de etanol (17,5%) e da taxa de ocupação de dornas fermentativas (22,7%) (Tabela 5). A alteração no *mix* de produção durante o período de aplicação do preparado enzimático foi adotada pela empresa como estratégia de aumentar a produção de açúcar, pois o mercado açucareiro apresentava-se em alta naquele momento. Assim, pode-se concluir que as alterações do *mix* de produção e da dosagem do preparado enzimático contribuíram como fatores relevantes na redução do consumo de antiespumante e dispersante no processo industrial de produção de bioetanol (Figura 22 e Tabela 5). Além disso, o ensaio 1 não mostrou diferenças significativas (teste de *Tukey*) nos parâmetros de rendimento fermentativo e pH do levedo

tratado durante os períodos enzima e controle (Tabela 5 e Apêndice C).

No ensaio 2 foi constatado não haver diferenças significativas (teste de *Tukey*) entre os períodos controle e enzima para os seguintes parâmetros de processo: nível de contaminação, floculação, *mix* de produção e viabilidade celular, dosagem de dióxido de cloro, teor de levedo no vinho, teor alcoólico do vinho, pH do levedo tratado (Tabela 5 e Apêndice C). Assim, as análises microbiológicas resultantes do ensaio 2 não foram afetadas pela adição do preparado enzimático ao processo. Além disso, foi constatado neste ensaio (Tabela 5 e Apêndice C) não haver diferenças significativas (teste de *Tukey*) nos períodos enzima e controle dos seguintes parâmetros de processo: vazão de mosto, taxa de ocupação de dornas e produção de etanol, diferentemente do que ocorreu no ensaio 1 (Tabela 5 e Apêndice C). No entanto, no geral a utilização do preparado enzimático no ensaio 2 também contribuiu como fator relevante na redução do consumo de antiespumante e dispersante no processo (Figura 22 e Tabela 4). Apesar do ensaio 1 possuir diferenças nas variáveis do processo (vazão de mosto, produção de etanol, *mix* de produção, impureza no mosto e taxa de ocupação de dorna), pois o mercado de etanol apresentava-se em alta quando comparado ao açucareiro naquele momento, o mesmo possui importância igual ao ensaio 2, pois alterações na estratégia de produção no presente processo são comuns de serem adotadas. Portanto, a adição de preparado enzimático mostrou potencial de

redução do consumo de antiespumante e dispersante em ambos os ensaios (1 e 2) o que contribuiu com a diminuição de formação de espuma nas dornas fermentativas (Figura 23).

5.3. AVALIAÇÃO DE CUSTO DA APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO NO PROCESSO FERMENTATIVO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Ambos os ensaios avaliados (1 e 2) mostraram que no período enzima (aplicação do preparado enzimático) houve redução no consumo da $R_{d/e}$ (58% e 37%) e da $R_{a/e}$ (27% e 25%), respectivamente (Tabela 4). Desta forma, o ensaio 1 apresentou redução líquida de 15% no consumo de antiespumante, dispersante e de preparado enzimático. No entanto, o ensaio 2 apresentou aumento líquido de 9% no consumo de antiespumante, dispersante e de preparado enzimático. Desta forma, foram totalizados uma redução líquida de 0,40 R\$ por metro cúbico de etanol produzido (R\$/m³) para o ensaio 1 e aumento líquido de 0,18 R\$ por metro cúbico de etanol produzido (R\$/m³) para o ensaio 2, quando comparados os períodos enzima e controle (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação de custos dos ensaios 1 e 2 realizados no processo fermentativo de produção de bioetanol.

Insumos	Ensaio 1			Ensaio 2		
	Período Controle (R\$)	Período Enzima (R\$)	Dif. (%)	Período Controle (R\$)	Período Enzima (R\$)	Dif. (%)
Dispersante	62.916	25.528	-59 %	41.920	31.602	-25 %
Antiespumante	84.941	54.729	-36 %	50.978	39.713	-22 %
Preparado enzimático	x	44.880	+100 %	x	29.920	+100 %
Total	147.857	125.138	-15 %	92.899	101.235	+9 %
Fator R\$/m ⁻³		-0,40			+0,18	

O sinal (+) representa aumento líquido. O sinal (-) representa redução líquida. O símbolo (x) representa que não foi utilizado preparado enzimático no período controle, não havendo consumo deste insumo neste período. Fator R\$/m⁻³ = subtrai-se o custo total do período controle pelo custo total do período enzima e então divide-se pela produção de etanol do ensaio correspondente, obtendo-se o fator de redução (-), ou aumento (+) líquido.

Para exemplificação do potencial de uso de preparado enzimático nos ensaios 1 e 2 foi realizada uma avaliação de custos em relação a um dia de produção de bioetanol do processo fermentativo. Assim, no ensaio 1 a média de produção de etanol durante 74 dias foi de 764,9 m³ quando multiplicada pelo fator de 0,40 R\$/m³ (Tabela 6) obtêm-se uma redução de aproximadamente R\$ 306,00 por dia no consumo de insumos redutores de formação de excesso de espuma (correspondendo a uma economia de aproximadamente R\$ 9.200,00 a cada 30 dias de processo). Ao ser conduzido o mesmo procedimento com os dados do ensaio 2, a média de produção de etanol nos 54 dias foi de 864,4 m³ que quando multiplicada pelo fator de 0,18 R\$/m³ (Tabela 6) obtêm-se um aumento líquido de aproximadamente R\$ 156,00 por dia no consumo de insumos redutores de formação excesso de espuma (correspondendo com gasto de aproximadamente R\$ 4.670,00 a cada 30 dias de processo). Portanto, o ensaio 1 apresentou

viabilidade de custo, enquanto no ensaio 2 não foi viável o custo de aplicação de preparado enzimático.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados da aplicação de preparado enzimático como coadjuvante no combate a formação de espuma em processo industrial de produção de bioetanol as seguintes conclusões foram constatadas:

- Durante o período de aplicação de preparado enzimático no processo industrial de produção de bioetanol (ambos os ensaios) foram constatadas reduções expressivas no consumo de antiespumante e dispersante contribuindo para diminuição de formação de espuma nas dornas fermentativas;
- No ensaio 1, durante o período de aplicação do preparado enzimático, a empresa adotou a estratégia de reduzir o *mix* de produção de etanol (17,2%), pois o mercado açucareiro apresentava-se em alta naquele momento. Essa estratégia impactou em reduções dos seguintes parâmetros: vazão de mosto, produção de etanol e taxa de ocupação de dornas. Portanto, a alteração do *mix* de produção de etanol concomitante à dosagem de preparado enzimático contribuiu como fatores importantes para promover reduções significativas no consumo de antiespumante e dispersante;

- O ensaio 1 apresentou redução líquida de 15% com recursos para aquisição de insumos químicos resultando em uma economia de R\$ 0,40 para cada metro cúbico de etanol produzido no período de aplicação do preparado enzimático. Assim, o ensaio mostrou viabilidade no custo de aplicação de preparado enzimático;
- No ensaio 2 durante o período de aplicação do preparado enzimático, não houve redução significativa no *mix* de produção de etanol, pois o mercado de etanol apresentava-se em alta quando comparado ao açucareiro naquele momento. Desta forma, não houve reduções nos seguintes parâmetros: vazão de mosto, produção de etanol e taxa de ocupação de dornas. Todavia, a dosagem de preparado enzimático também resultou em reduções de consumo de antiespumante e dispersante;
- O ensaio 2 apresentou aumento líquido de 9% com recursos para aquisição de insumos químicos resultando em um gasto de R\$ 0,18 para cada metro cúbico de etanol produzido no período de aplicação do preparado enzimático. Assim, o ensaio não mostrou viabilidade no custo de aplicação de preparado enzimático;
- Por fim, há indicativos que a diminuição do *mix* de produção de etanol seria estrategicamente o momento mais

adequado para a aplicação do preparado enzimático no processo industrial de produção de etanol;

7. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E. M. B.; SOUZA-MOTTA, C.M.; WALTER, B. S.; SANTOS, R. M. P.; MARQUES, O. M.; QUEIROZ, L. A. Fermentation capacity of *saccharomyces cerevisiae* cultures. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 52, n. 4, p. 819-824, July/Aug., 2009.
- BASSO, L. C. et. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, n.7, p.1155-1163, 2008.
- BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production - Recent Developments and Prospects**, v. 1530, p. 85–100, 2011.
- BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações**: fundamentos de Bioprocessos. 1ed. São Carlos: EdUFSCar, 2010. 162 p. (Coleção UAB-UFSCar).
- BEROVIC, M. Foam problems in fermentation processes. **Chem. Ind.** v. 39, 12, p. 567-573 , 1990.
- BEROVIC, M.; CIMERMAN, A. Foaming in submerged citric acid fermentation on beet molasses. **Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 7, p. 313-319, 1979.
- BLACK-ALL, L. L.; MARSHALL, K. C. The mechanism of stabilization of Actinomycete foams and the prevention of foaming under laboratory conditions. **Ind. Microbiol.**, v. 4, 181-188 , 1989.
- BRASIL, 2017. Lei Nº 13.576, de 26 de Dezembro de 2017. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/L13576.htm. Acesso em: 11 jun. 2020.

BRYANT, J. Anti-foam agents, in N. Ribbon and R. Norris (eds.), **Methods in Microbiology**, p. 187-203.,1970.

BUNGAY, H R; SIMONS, C. F.; HOVLER, P. Handling of antifoam oils for fermentations, **J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.** v. 2, n. 2, p. 143-155, 1960.

BUMBULLIS, W., KALISCHEWSKI, K., SCHUGERL, K. Foam behaviour of biological media. II Salt effects. **Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.7, p. 147-154, 1979.

CARVALHO, E. R. **Transformações socioterritoriais do capital sucroalcooleiro em Iturama, Pontal do Triângulo Mineiro.** 2009. 192 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Geografia, Universidade Federal de Uberlândia, 2009. Disponível em:

<<http://www.lagea.ig.ufu.br/biblioteca/dissertacoes/EduardoRozettiCarvalho.pdf>>.

Acesso em: outubro de 2019.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Clean in place systems for industrial bioreactors: Design, validation and operation, **J. Ind. Microbiol.** v. 13, p. 201-207, 1994.

CILLIERS, J.J.; ASPLIN, R.A.; WOODBURN, E.T. Kinetic flotation modelling using froth imaging data. In: LASKOWSKI, J.S.; WOODBURN, E.T. **Frothing in Flotation II.** The Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers, 1998. p. 309– 336.

CODISTIL. **Manual de Operação das Destilarias de Álcool Etílico.** Piracicaba: Departamento de Engenharia, 1978.

CONAB. Análise Mensal Cana-de-açúcar Abril/maio de 2020. Disponível em: <<file:///C:/Users/lidia/Downloads/Cana-de-acucarZ-ZAnaliseZMensalZ-ZAbrilZ-Z2020.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

COPERSUCAR. **Fermentação.** São Paulo: CTC, 1987.

DUITSCHAEVER, C. L.; BUTEAU, C.; KAMEL, B. S. An investigation on the efficiency of antifoaming agents in aerobic fermentation. **Process Biochem.**, v 23, n. 6, p. 163-165, December, 1988.

EVANS, J. I.; HALL, M. J. Foams and antifoams in fermentation. **Process Biochem.** V. 6, n. 4, p. 23-26, April, 1971.

FAMEAU, A.; LAMB, S.; VELEV, O. D.; Multi-stimuli responsive foams combining particles and self-assembling fatty acids. **Chem. Sci.**, v. 4, p. 38-74, 2013.

FANG, J.; MA, J.; YANG, X.; SHANGC, C. Formation of carbonaceous and nitrogenous disinfection by-products from the chlorination of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1934-1940, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.046>.

GHILDYAL, N. P.; LONSANE, B. K.; KARANTH, N. G. Foam control in submerged fermentation: state of the art. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 33, p. 173-222, 1988.

HALL, M J.; DICKINSON, S. D.; PRITCHARD, R.; EVANS, J. I. Foams and foam control in fermentation processes. **Prog. Ind. Microbiol.** v. 12, p. 171-231, 1971.

KHAN, A. R.; KOCIANOVA, E.; FORSTER, C. F. Activated sludge characteristics in relation to stable foam formation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 52, p. 383-392, 1991.

KOTSARIDU, M.; MULLER, B.; PFANZ, V.; SCHUGERL, K. Foam behaviour of biological media: X. Influence of the sterilization conditions on the foaminess of PPL solutions. **Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 17, p. 258-260, 1983.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial.** 2 ed. v. 3. Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2019. 760p,

MANCY, K. H.; OKUN, D. A. Effects of surface active agents on bubble aeration. **J. Wat. Poll. Cont. Fed.** v. 32, p. 351-364, April, 1960.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980. p. 141 – 178, 2008.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. Breve descrição do proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil. In: SOBER, editor, XLVI Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. **Anais**. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Brasília.

MILANEZ, A.Y. et al. **Da promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública**. Brasília: BNDES, 2015. 58 p. (BNDES Setorial, 41).

NETO, I. E. L. Desestratificação de reservatórios por meio de aeração artificial. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.24, n. 2, março/abril, 2019. DOI: 10.1590/S1413-41522019184389.

NIELSEN, J. C.; LINO, F.S O.; RASMSEN, T. G.; THYKAER, J.; WORKMAN, C. T.; BASSO, T. O. Industrial antifoam agents impair ethanol fermentation and induce stress responses in yeast cells. **Appl microbiol biotechnol.**, 101:p. 8237-8848, 2017. [Http://doi.org/10.1007/s00253-017-8548-2](http://doi.org/10.1007/s00253-017-8548-2).

NOBLE, I. C. M.; PORTER, N.; VARLEY, J. An investigation of the physicochemical basis of foaming in fungal fermentations. **Biotechnol. Bioeng.** v. 44, p. 801-807, 1994.

NOVOZYMES 2020. Disponível em: <<http://www.bioblog.com.br/prevencao-de-espuma-com-alta-performance/>>. Acesso em: outubro de 2020.

PAGILLA, R. K. et al. **Mechanisms of foam formation in anaerobic digesters**. Department of Civil, Architectural, and Environmental Engineering. Chicago, Il.: Illinois Institute of Technology, 2014.

PETER, R. **Engenharia do açúcar de cana**. São Paulo: Bartens, 2013. p. 95-96.

PRINS, A.; VAN'T RIETIET, K. Proteins and surface effects in fermentation: Foam, antifoam and mass transfer. **Trends Biotechnol.** v. 5, p. 296-301, 1987.

RAZAK, M. A.; BUDDOLLA, V. Otimização de parâmetros a montante da fermentação e imobilização de *Corynebacterium glutamicum* Células B MH 20-22 para melhorar a produção de L- lisina. **Biotech.**, v. 5, p. 531-540, 2015. DOI: 10.1007 / s13205-014-0252-7.

RIBEIRO, E. J. Fermentação Alcoólica. Uberaba, 2010. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. FAZU. RIBEIRO, F. A. M. Álcool e açúcar: uma via de mão dupla. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). **Álcool combustível – série indústria em perspectiva**. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, 2008. p. 48- 57.

ROUTLEDGE, S. J. Além da espuma: os efeitos dos antiespumantes na produtividade dos bioprocessos. **Comput Struct Biotechnol J.** v. 2012, n. 3, e201210014. 2012. Doi: 10.5936/ csbj.201210014.

SCHUGERL, K.; LUCKE, J.; LEHMANN, J.; WAGNER, F. Application of tower bioreactors in cell mass production. **Adv. Biochem. Eng.** v. 8, p. 63-131, 1978.

SELANI, R. L. **A evolução da cana-de-açúcar no Escritório de Desenvolvimento Rural (EDR) de Ourinhos e o papel das esferas públicas e das agroindústrias do açúcar e do álcool no processo de organização do espaço**. Rio Claro. 2005. 464 f. Dissertação (Mestrado em Organização do Espaço) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

SPEROTTO, R. A. (Org.). **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Lajeado: Editora da Univates, 2014. 188 p. ISBN 978-85-8167-077-5,1. (Biotecnologia 2. Práticas de laboratório).

SUKAN, S.; VARDAR, F.; GURAY, A. Evaluation of natural oils as antifoam agents in bioconversion of cellulosic substrates, **Third Europ. Congr. Biotechnol.** München, Germany, September, 10-15, n. 2, p. 203-211, 1984.

SZARKA, L.; MAGYAR, K. The foams of fermentation broths: I. Some parameters of the foaming of fermentation media. **Biotechnol. Bioeng.** v. 2, p. 701-710, 1969.

SZMRECSÁNYI, T. **O planejamento da agroindústria canvieira do Brasil (1930 – 1975)**. São Paulo: Hucitec, 1979. 540 p.

TAPIA, E. N.; NANA, R.K.; QUEROL, A.; TORRADO, R. P. **Defesa celular de etanol induz resposta proteica não dobrada em leveduras**. Instituto de Agroquímica e Tecnologia dos Alimentos - Conselho Superior de Investigações Científicas, Valencia, Espanha, 2016. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00189.

UNICA. Disponível em <<http://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=63>>. Último acesso em: setembro de 2019.

URAZEE, F.; NARSIMHAN, G. Foam fractionation of proteins and enzymes: II. Performance and modelling. **Enzyme Microbial. Technol.** v. 12, p. 315-316, 1990.

USINA. ME.SCI.LAL.01. Métodos de controle Químico Fermentação. Rev. 01. Maio, 2016. p. 132 – 158, 2020.

VAN'T RIET, K.; PRINS, A.; NIEUWNHUIJSE, J. A. Some effects of foam control by dispersed natural oil on mass transfer in a bubble column. **Third Europ. Congr. Biotechnol.**, München, Germany, September, 10-14, 3, 521-525, 1984.

VASCONCELOS, J. N. DE. Ethanol fermentation. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Ed.). **Sugarcane: Bioenergy, Sugar and Ethanol Technology and Prospects**. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/ACS: UFV/DEA, 2012. cap. 15, p. 451-487, 2012. ISBN: 978-85-7991-058-6.

VARDAR-SUKAN, F. Efficiency of natural oils as antifoaming agents in bioprocesses. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** v. 43, p. 39-47, 1988.

VIESTURS, U. E.; KRISTAPSONS, M. Z.; LEVITANS, E. S. Foam in microbiological processes. **Adv. Biochem. Eng.** v. 21, p. 169-224, 1982.

VRANA, D. SEICHERT, L. Cytomorphological comparison of mechanical and chemical defoaming of a yeast culture. **Folia Microbiol.** v. 33, p. 144-147, 1988.

YOSHII, R. J.; MATSUNAGA, M. “**Comentários sobre o Programa Nacional do Alcool e a Produção de Alimentos**”. Informações Econômicas. Instituto de Economia Agrícola. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1984.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON, E. P. S.; GIORDANO, R. C. L.; MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; CARVALHO NETO, C. C.; MACEDO, I. C.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian Bioethanol Program. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 84, p. 1147, 2000.

ZEDNIKOVA, M.; BASAROVA, P. Effect of Surfactants on Bubble-Particle Interactions. In: DUTTA, Ashim. (Editor). **Surfactants and Detergents**. London: IntechOpen, 2019. Chapter 3, p. 1-14, DOI:10.5772/intechopen.85436, 2019.

APÊNDICE A. METODOLOGIA DE ANÁLISES LABORATORIAIS

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AÇÚCARES

Para a determinação dos açúcares (sacarose, frutose e glicose) foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso a amostra foi previamente diluída e filtrada em membrana de 0,45 µm. Para a análise foi utilizado um cromatógrafo de íon (marca Thermo, modelo ICS-5000+DC), munido com uma coluna (Dionex Carbo Pac TM PA1 4 x 250 mm), vazão de fluxo de 1,25 mL.min⁻¹ e temperatura de forno de 25 °C. Para a detecção foi utilizado um detector do tipo eletroquímico (ICS-500+DC), a 25 °C.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE IMPUREZAS

Para determinação do teor de impurezas a amostra foi homogeneizada em frasco de coleta de 500 mL. Em seguida a amostra foi transferida para um tubo de vidro (100 mL) e acertado até o menisco. Então, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 min. Ao término da centrifugação foi realizada a leitura no tubo de vidro, medindo o material precipitado (*pellet*) da parte inferior até a superior na régua em sua lateral. O valor de impurezas foi calculado conforme a Equação 1.

$$I = V/S * 100 \% \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

I = Impurezas (%).

V= Volume de impurezas decantadas (*pellet*) (mL).

S = Somatória dos volumes (*pellet* + solução límpida) (mL).

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL

Para a determinação do teor de etanol foi utilizado o densímetro eletrônico digital (Anton Paar). Para isso a amostra foi previamente destilada no funil do densímetro por 3 vezes e então foi realizada a leitura do grau (°GI) diretamente no “display” do equipamento.

DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Para procedimento de determinação do nível de contaminação foram preparadas duas soluções, como se segue: solução A: sulfato azul de Nilo 2 % (massa/volume): solução B: azul de metileno a 0,2 % (massa/volume). Em seguida as soluções A e B foram misturadas em partes iguais, obtendo-se a solução C, que permaneceu em repouso por 24 h a 25°C. Após o repouso a solução C foi filtrada em papel de filtro e estocada até o seu uso. 5 mL da amostra foi homogeneizar e transferida para um tubo de ensaio. Algumas gotas de papaína foram adicionadas ao tubo o qual foi homogeneizado em agitador vortex. Então, a amostra previamente diluída foi misturada com a solução C (em parte iguais) e homogeneizada em agitador vortex gerando a solução D. Foi

preparada a câmara de *Neubauer*, cobrindo a superfície espelhada com uma lamínula. Então, foi transferida a solução D em um volume suficiente para preencher a câmara de *Neubauer* e analisado ao microscópio óptico pela imersão (objetiva de 100 x). Então, foi realizada a contagem de bastonetes não corados (viáveis) presentes nos 4 retículos centrais de 25 quadrículos da câmara de *Neubauer*. Os bastonetes corados de azul não foram contados.

O cálculo do nível de contaminação bacteriana foi realizado conforme a Equação 2.

$$B = C/N * V * FD * FM \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

B = Contaminação bacteriana. (Bastonetes.mL⁻¹).

C = N° de bastonetes contados.

N = N° de campos do microscópio.

V = Volume da amostra (mL).

FD = Fator de diluição (mL).

FM = Fator de imersão do microscópio (x).

DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para a determinação da viabilidade celular foi pesado 0,1 g de eritrosina que foi dissolvida em 10 mL de água destilada autoclavada. Também foi pesado 17,9 g de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e dissolvido em 250 mL de água destilada autoclavada. Então, misturaram-se as duas soluções, obtendo-se a solução A.

Em seguida foi pesado 6,89 g de fosfato monossódico anidro (NaH_2PO_4) que foi dissolvido em 250 mL de água destilada autoclavada obtendo-se a solução B. Na sequência foram misturadas as soluções A e B, obtendo-se a solução C. A solução C foi adicionada em geladeira conservando sob refrigeração. 5 mL da solução C foram transferidos para um tubo de ensaio o qual foi também adicionado papaína (para desfloculação da amostra). Na sequência o tubo foi agitado e permaneceu em repouso por 5 min. 1 mL da amostra resultante previamente diluída foi transferida para outro tubo de ensaio, o qual continha 1 mL de solução de eritrosina (P.A), a qual foi homogeneizada em agitador vortex, obtendo-se a solução D. Foi preparada a câmara de *Neubauer*, cobrindo a superfície espelhada com uma lamínula. Então, foi transferida a solução D em um volume suficiente para preencher a câmara de *Neubauer* e analisado ao microscópio óptico pela imersão (objetiva de 100 x). Foram quantificadas células vivas, mortas e brotos presentes nos 4 retículos centrais dos 25 quadrículos da câmara de *Neubauer*. Três tipos de células foram quantificadas: células incolores (viáveis), células coradas em rosa (não viáveis) e brotos não corados (viáveis). Os brotos corados em rosa (inviáveis) não foram quantificados.

Então, foi realizado o cálculo conforme a Equação 3.

$$VB = T * CT * 100 \% \text{ (Equação 3)}$$

Onde:

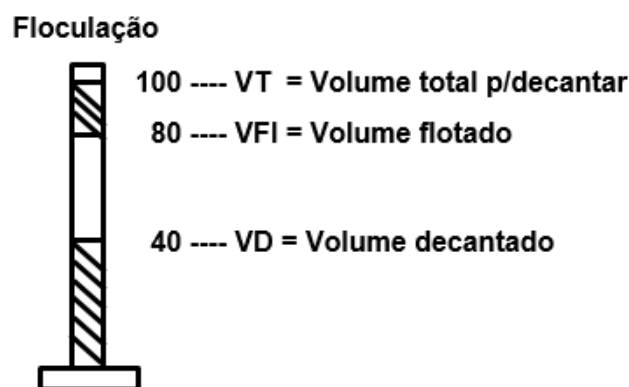
VB = Viabilidade celular (% células viáveis).

T = N^o total de células vivas.

CT = 1/(N^o total de células vivas + N^o total de células mortas).

DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE FLOCULAÇÃO

A amostra foi adicionada em uma proveta graduada de vidro de 100 mL que permaneceu em repouso por 15 min. Após o repouso foi realizada a leitura, conforme apresentado no esquema abaixo.



Esquema de determinação do nível de floculação. **Fonte:** manual de métodos analíticos (USC, 2020).

Então, foi realizado o cálculo conforme a Equação 4.

$$F = (VFI - VD)/VT * 100 \% \text{ (Equação 4)}$$

Onde:

F = Floculação (%).

VFI = Volume flotado (mL).

VD = Volume decantado (mL).

VT = Volume total (mL).

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LEVEDO

Para determinação do teor de levedo a amostra foi homogeneizada e transferida para dois tubos *Falcons* até a marca de 10 mL. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. Ao término da centrifugação foi realizada a leitura do volume total e de sólidos decantados no fundo dos tubos *Falcons*.

Então, foi realizado o cálculo conforme a Equação 5.

$$L = VL/VT * 100 \% \text{ (Equação 5)}$$

Onde:

L = Teor de levedo (%).

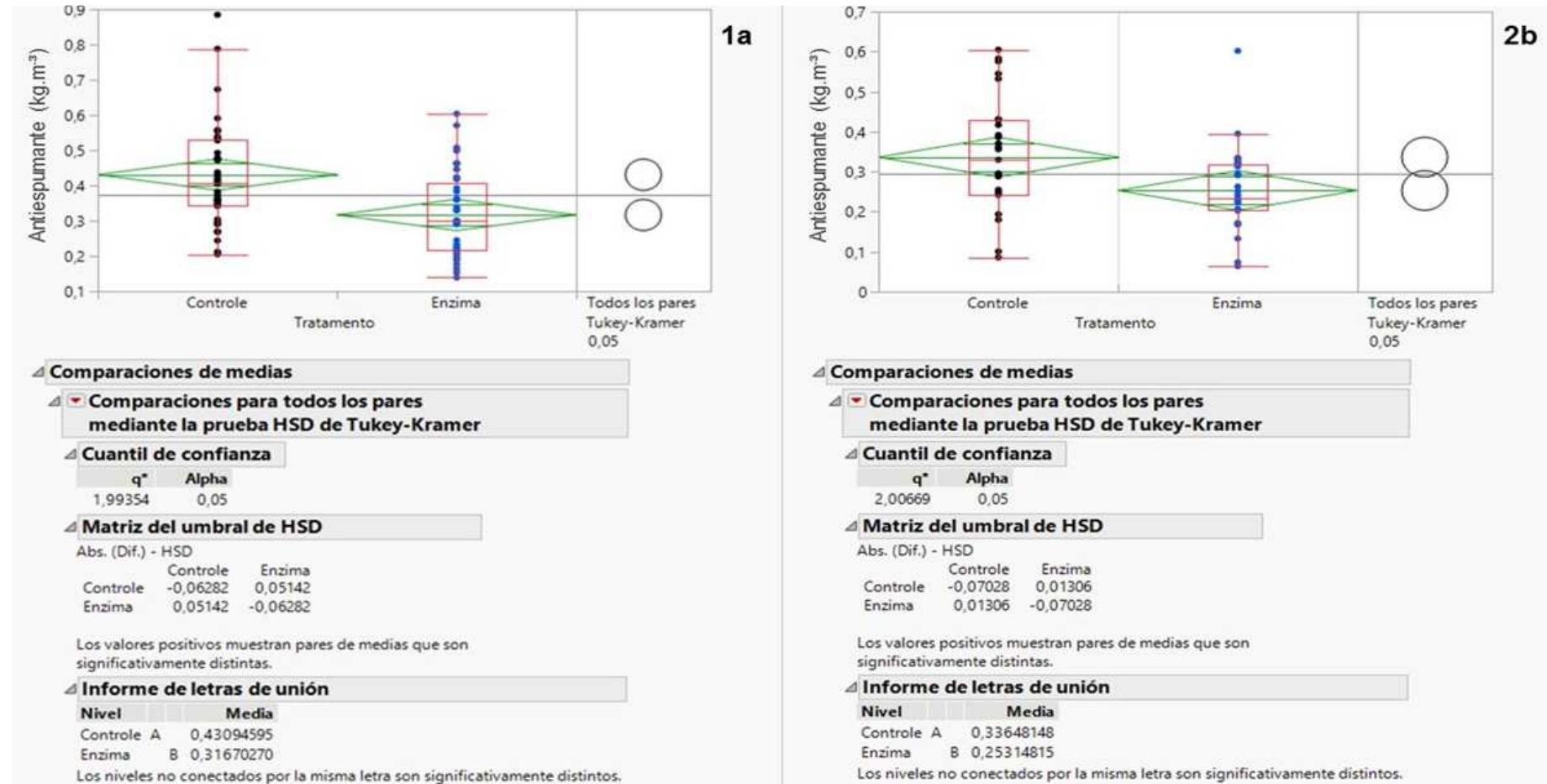
VL = Volume inferior de levedo (mL).

VT = Volume total da amostra (mL).

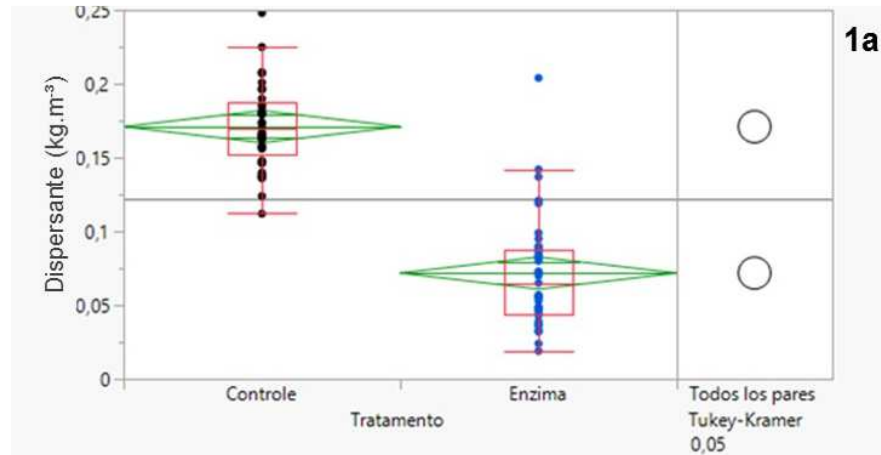
DETERMINAÇÃO DO PH

Para determinação do pH a amostra foi resfriada até 25 °C e em seguida foi transferida para um béquer e introduziu-se o eletrodo na amostra até cobrir o bulbo de vidro tomando o cuidado de manter o nível de amostra abaixo do nível do eletrólito e então foi realizada a leitura de pH no “*display*” do pHmetro.

APÊNDICE B. TESTES DE TUKEY REFERENTES A TABELA 4. DOSAGEM DE INSUMOS



Consumo de antiespumante em processo industrial de produção de bioetanol (quilograma de antiespumante por metro cúbico de etanol, $R_{a/e}$). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

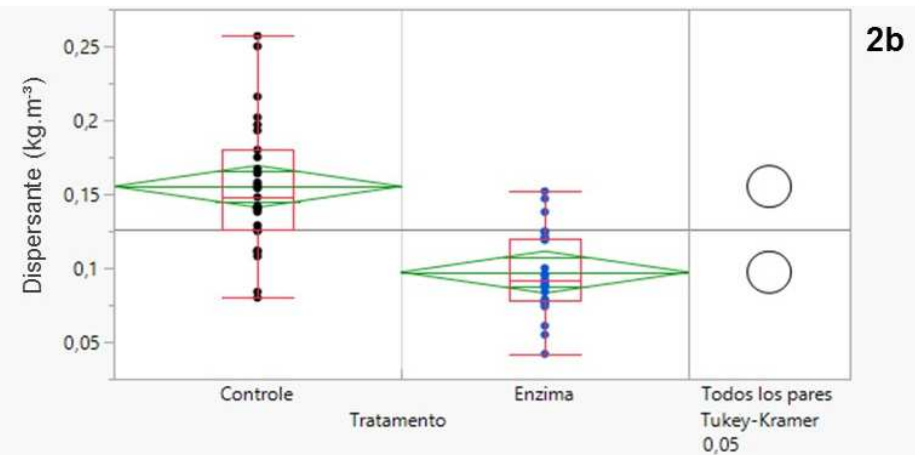
Abs. (Dif.) - HSD		
	Control	Enzima
Control	-0,01537	0,08382
Enzima	0,08382	-0,01537

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Control	A 0,17097297
Enzima	B 0,07178378

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD		
	Control	Enzima
Control	-0,01997	0,03803
Enzima	0,03803	-0,01997

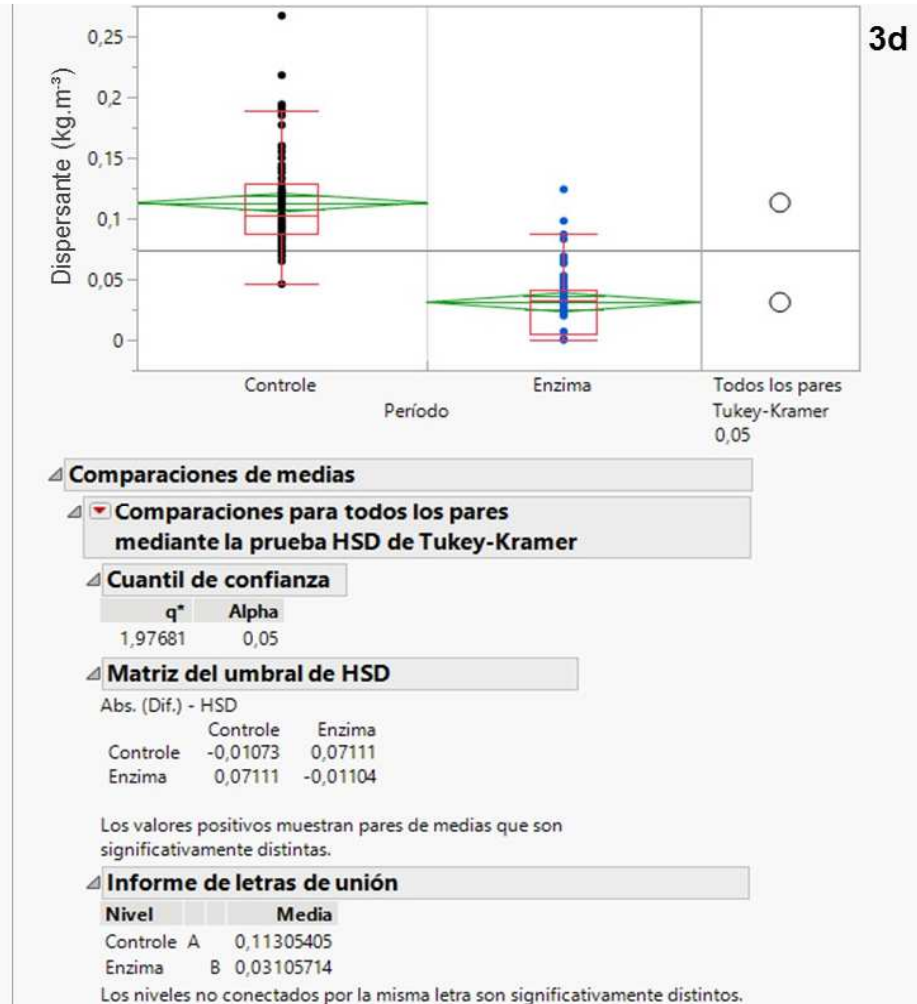
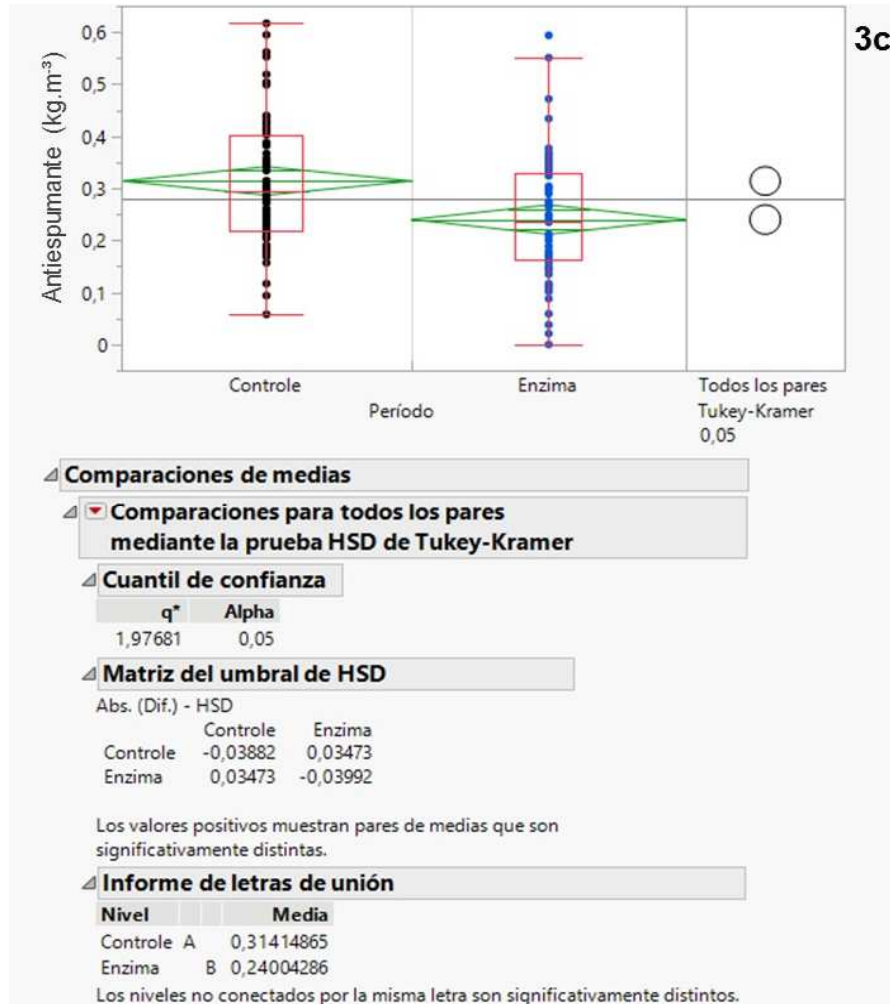
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Control	A 0,15522222
Enzima	B 0,09722222

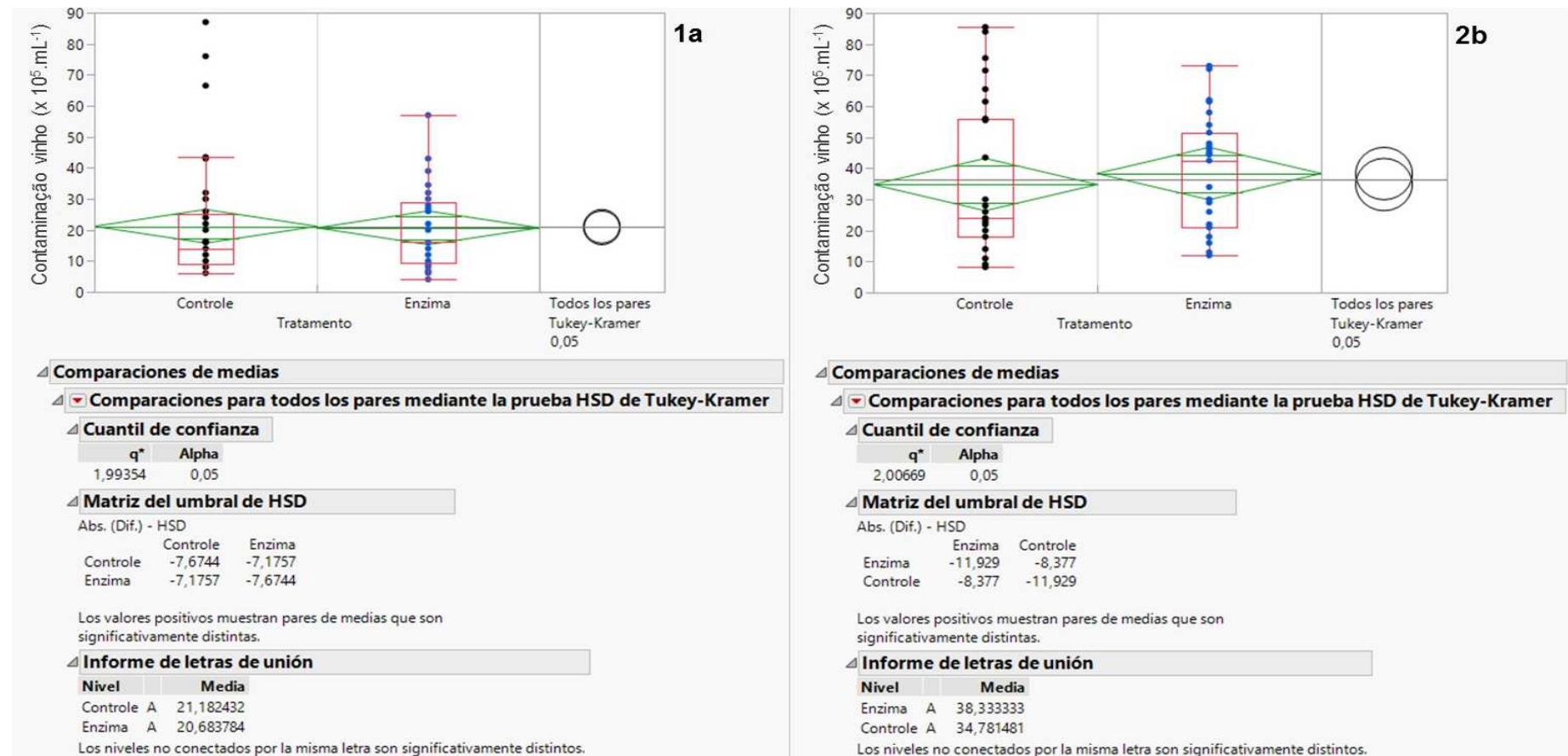
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Consumo de dispersante em processo industrial de produção de bioetanol (quilograma de dispersante por metro cúbico de etanol, $R_{d/e}$). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.

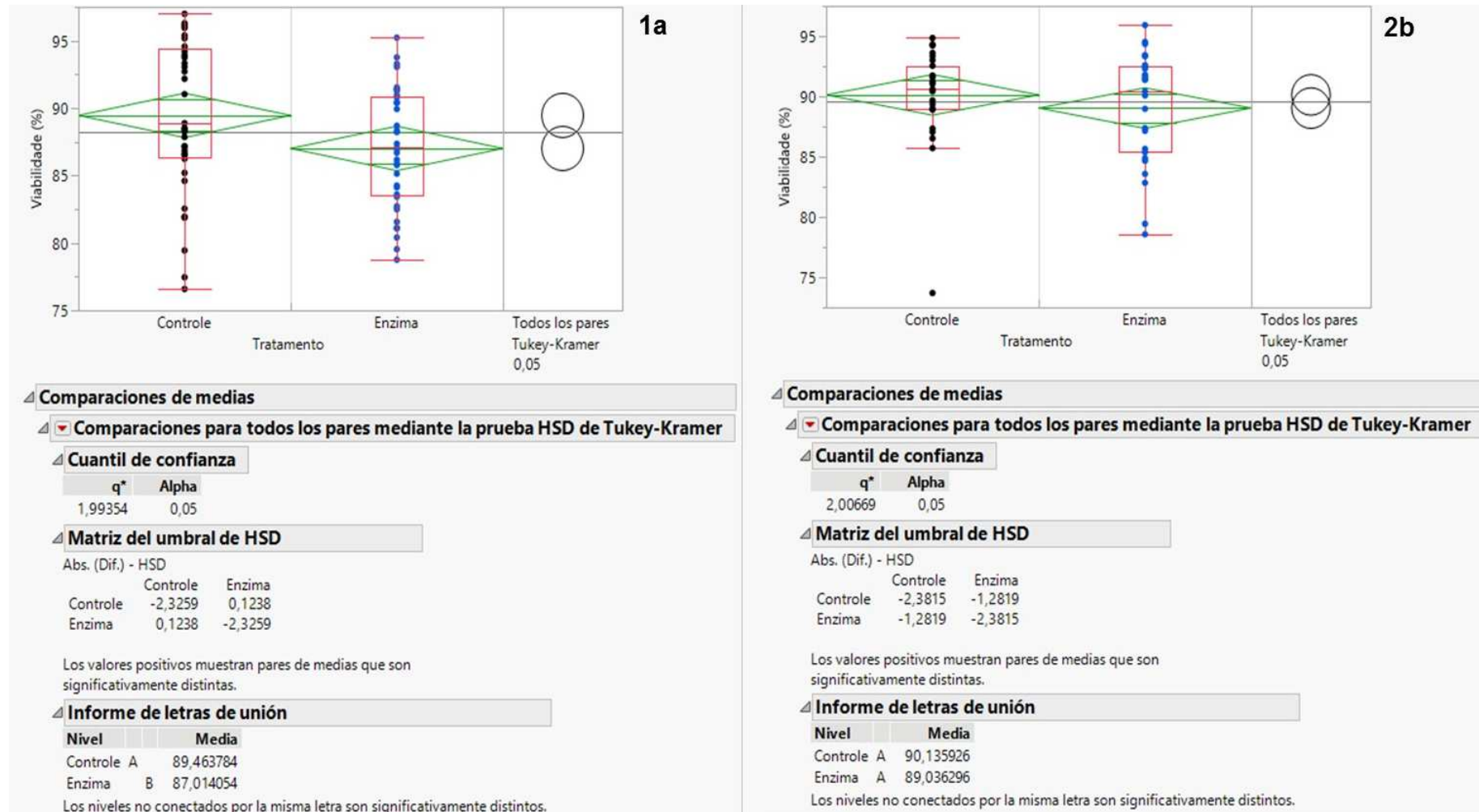


Consumo de antiespumante e dispersante em processo industrial de produção de bioetanol (quilograma de dispersante por metro cúbico de etanol, $R_{a/e}$ e $R_{d/e}$). (3c) Ensaio 3, antiespumante. (3d) Ensaio 3, dispersante. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.

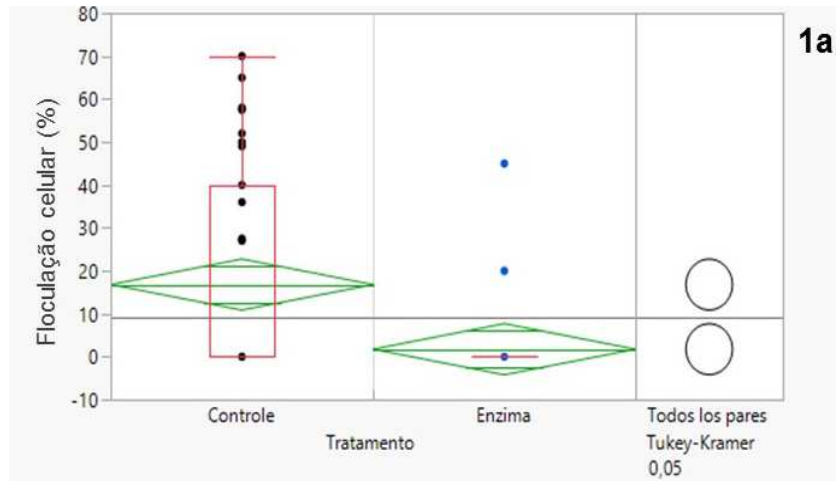
APÊNDICE C. TESTES DE TUKEY REFERENTES A TABELA 5. VARIÁVEIS DO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL



Contaminação no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (10^5 bastonetes por mL^{-1}). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Viabilidade celular no vinho em processo industrial de produçao de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

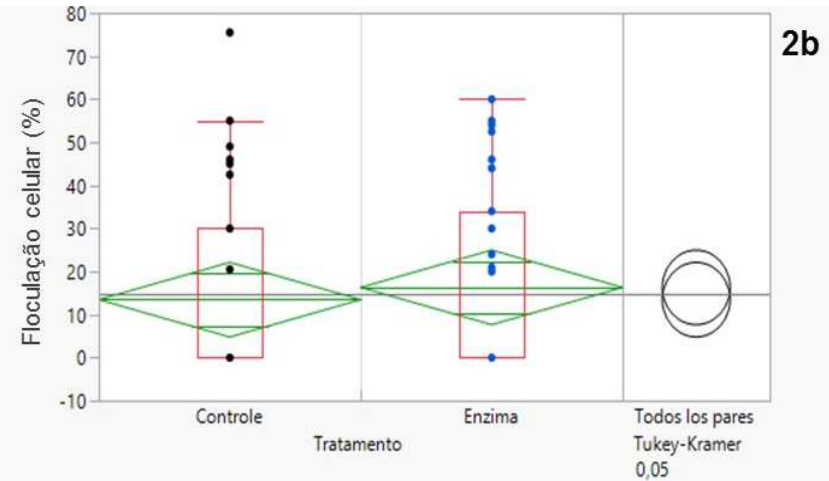
	Control	Enzima
Control	-8,4154	6,6386
Enzima	6,6386	-8,4154

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Control	A 16,810811
Enzima	B 1,756757

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Enzima	Control
Enzima	-12,244	-9,392
Control	-9,392	-12,244

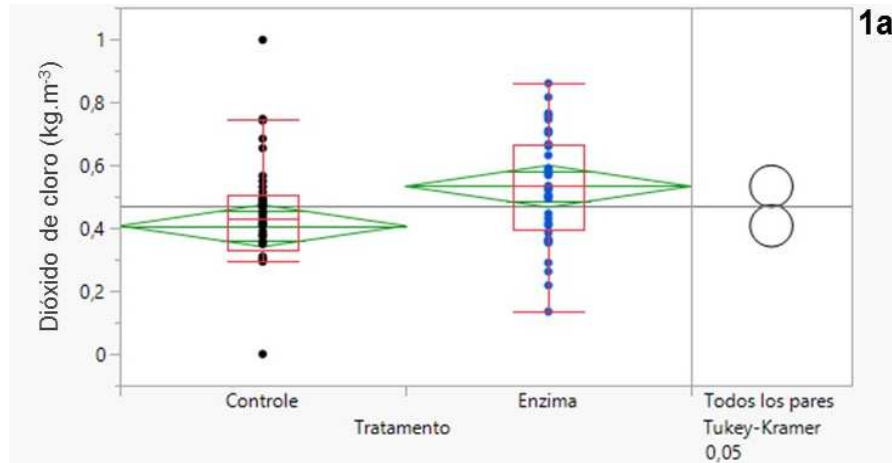
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima	A 16,314815
Control	A 13,462963

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Floculação celular no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

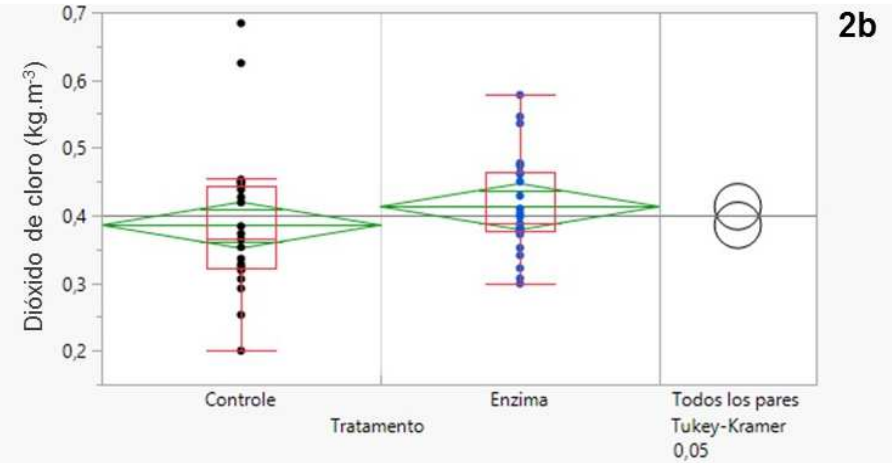
Abs. (Dif.) - HSD	Enzima	Controle
Enzima	-0,09398	0,03167
Controle	0,03167	-0,09398

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel		Media
Enzima	A	0,53278378
Controle	B	0,40713514

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD	Enzima	Controle
Enzima	-0,04816	-0,02075
Controle	-0,02075	-0,04816

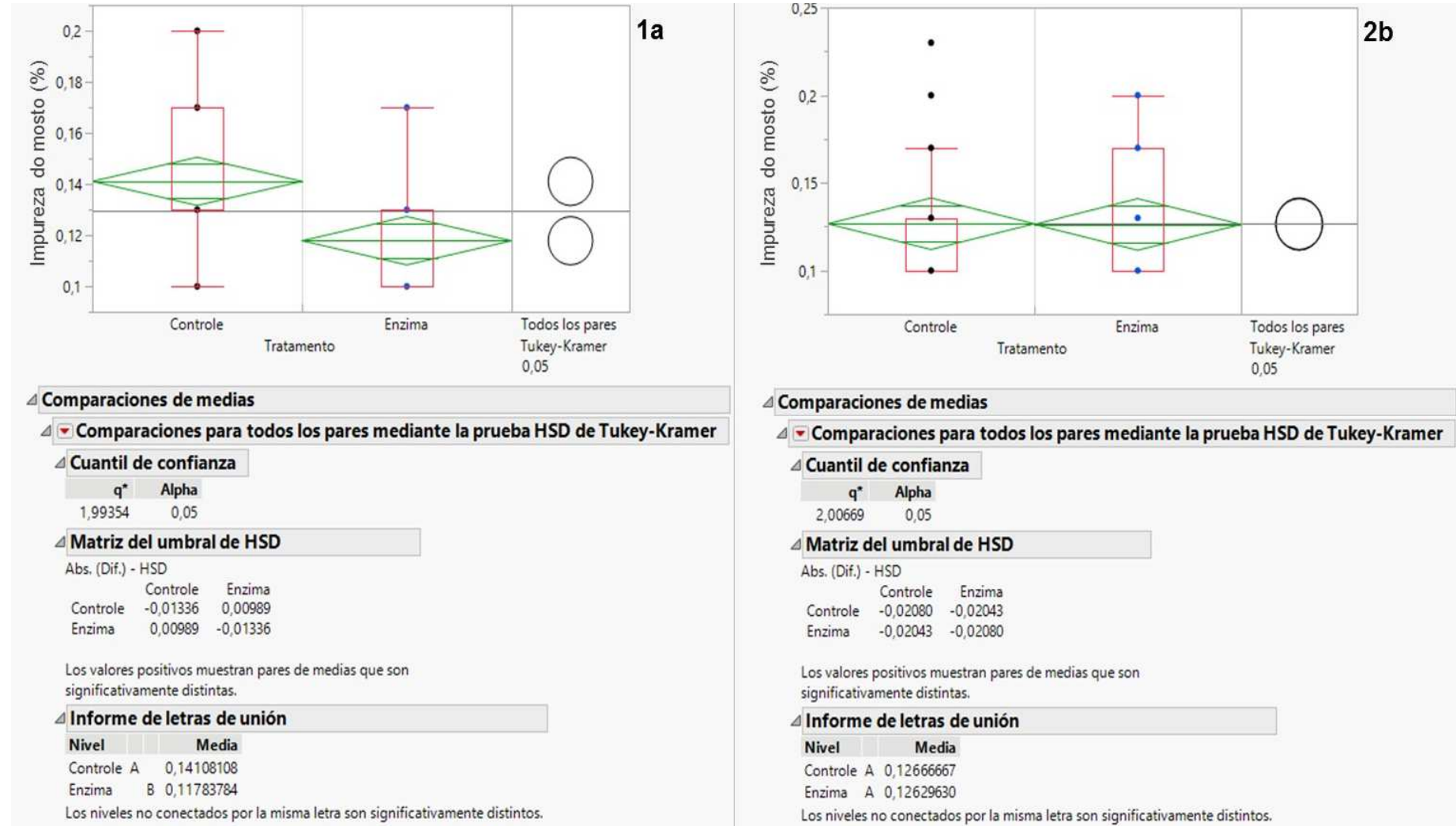
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

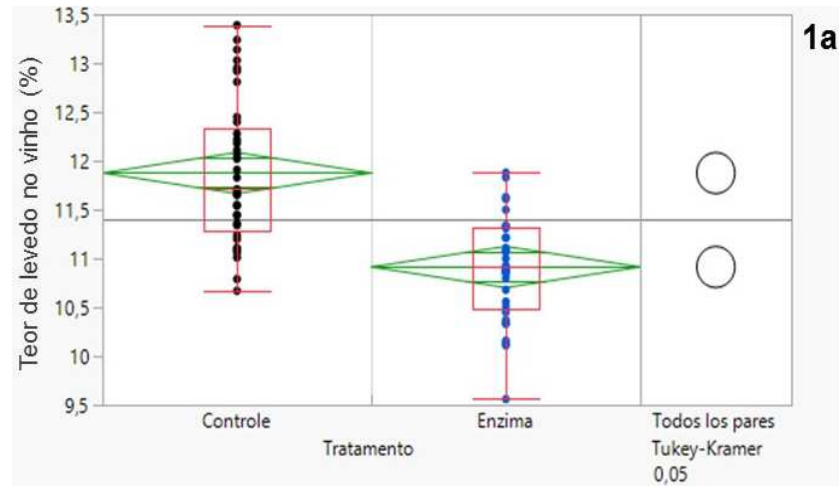
Nivel		Media
Enzima	A	0,41288889
Controle	A	0,38548148

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Consumo de dióxido de cloro em processo industrial de produção de bioetanol (quilograma dióxido de cloro por metro cúbico de etanol, $R_{dc/e}$). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Impureza do mosto em processo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

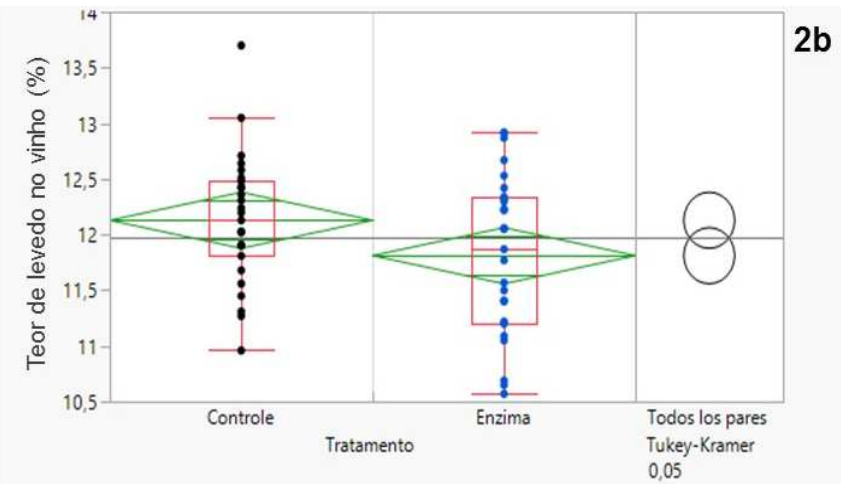
	Controle	Enzima
Controle	-0,29867	0,66404
Enzima	0,66404	-0,29867

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	11,876216
Enzima B	10,913514

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Controle	Enzima
Controle	-0,35656	-0,03878
Enzima	-0,03878	-0,35656

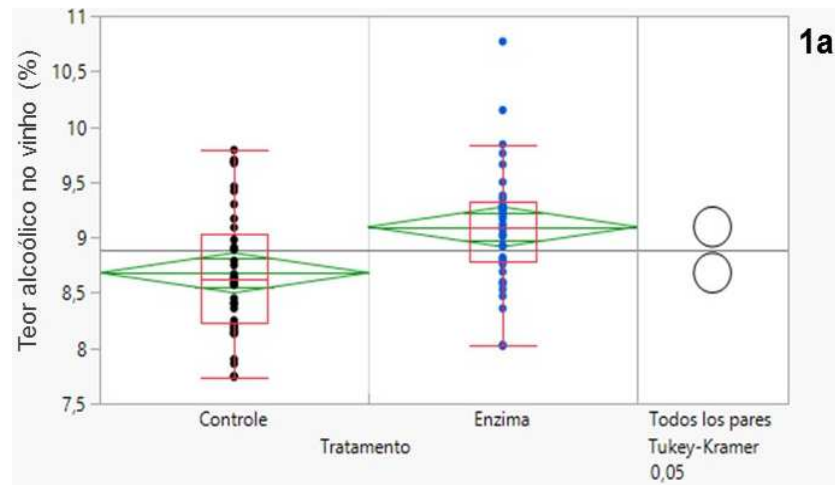
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	12,129630
Enzima A	11,811852

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Teor de levedo no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

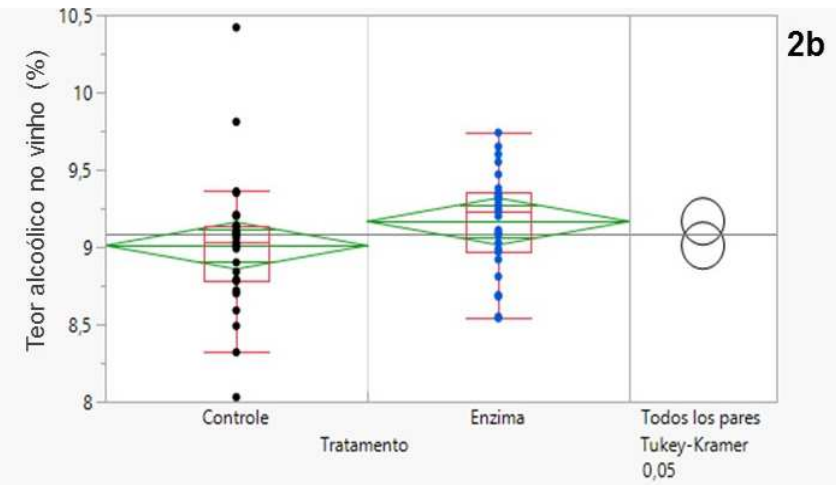
	Enzima	Controle
Enzima	-0,25430	0,16056
Controle	0,16056	-0,25430

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima	A 9,0954054
Controle	B 8,6805405

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Enzima	Controle
Enzima	-0,21352	-0,05722
Controle	-0,05722	-0,21352

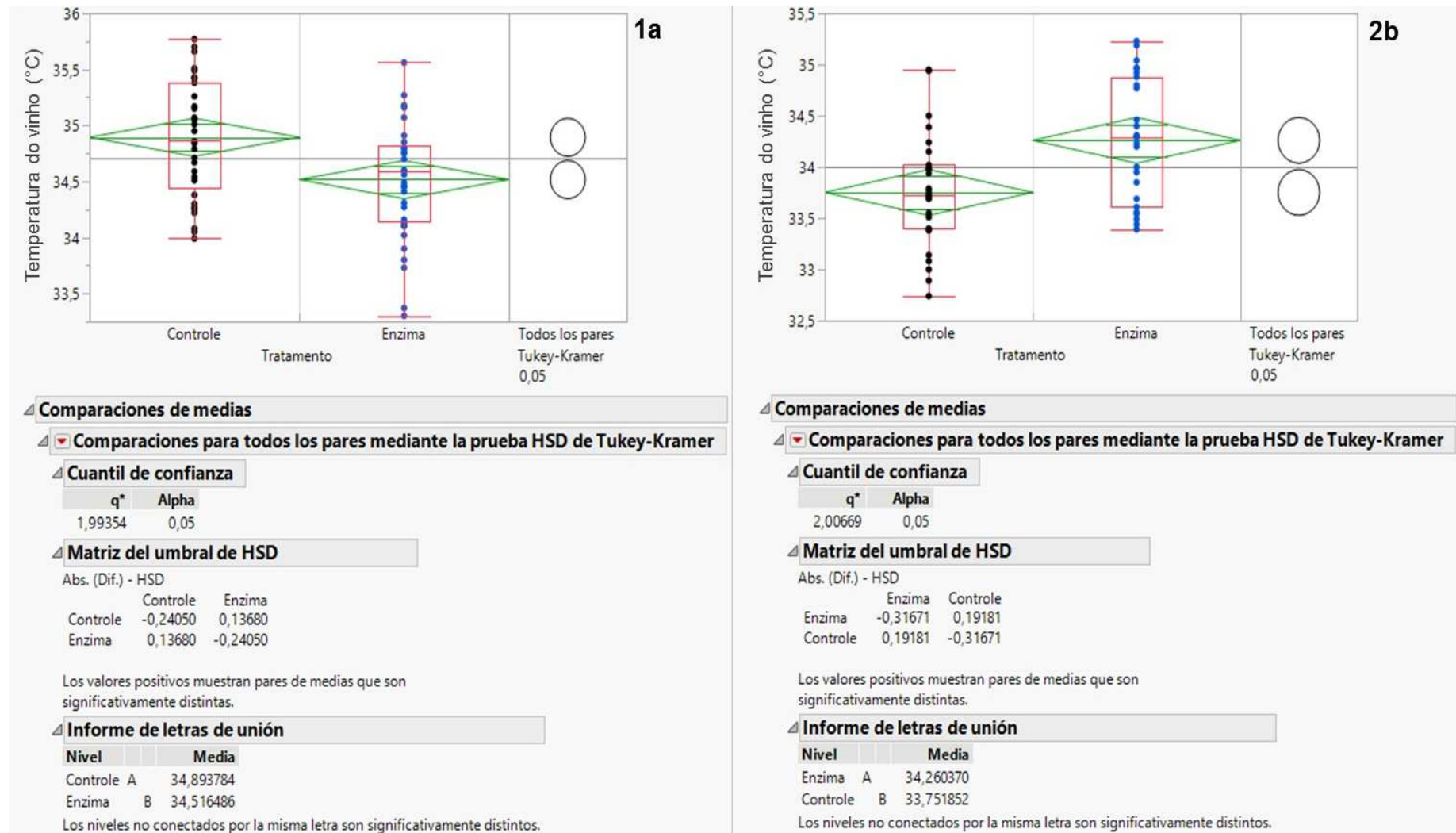
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

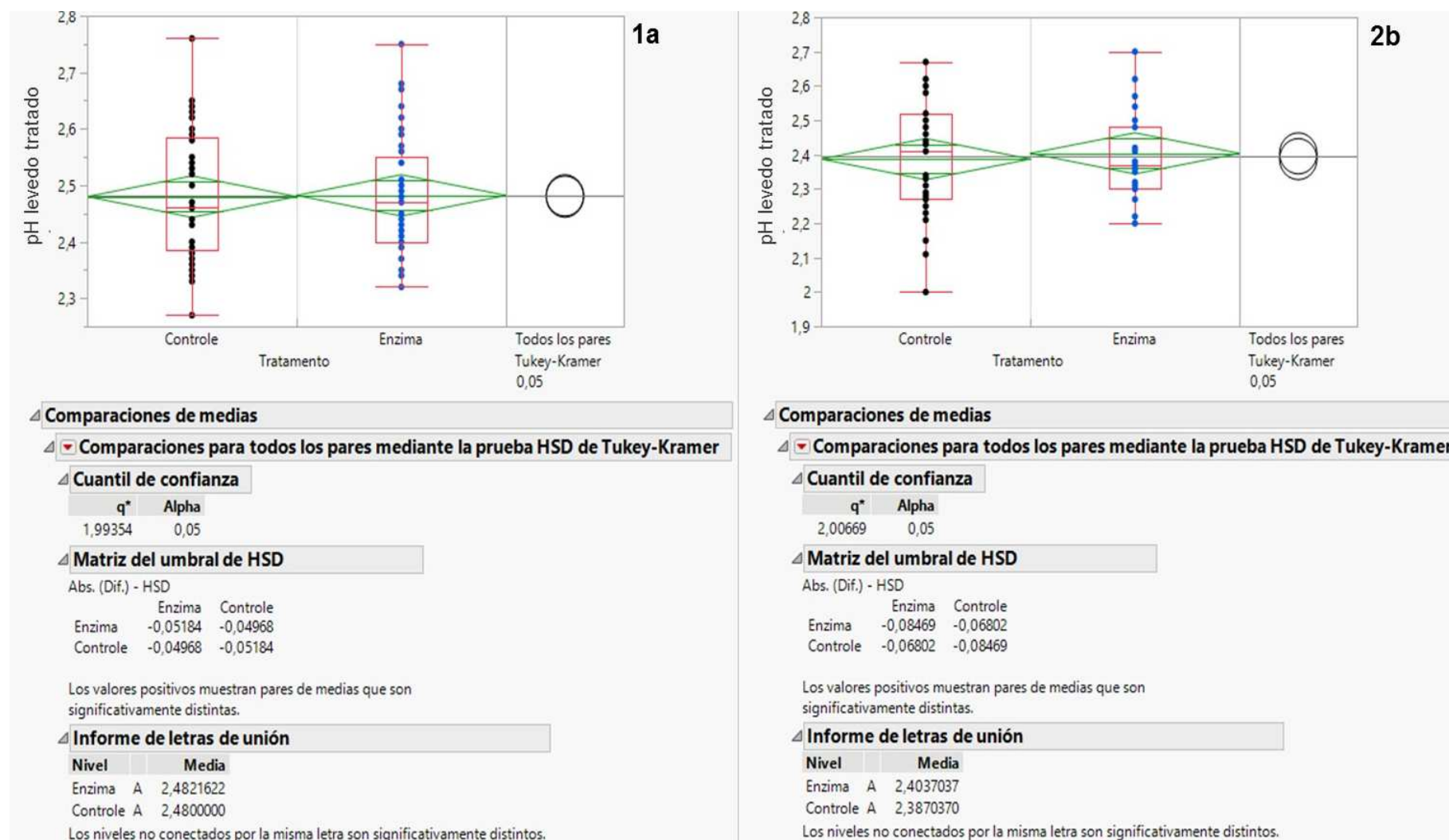
Nivel	Media
Enzima	A 9,1659259
Controle	A 9,0096296

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

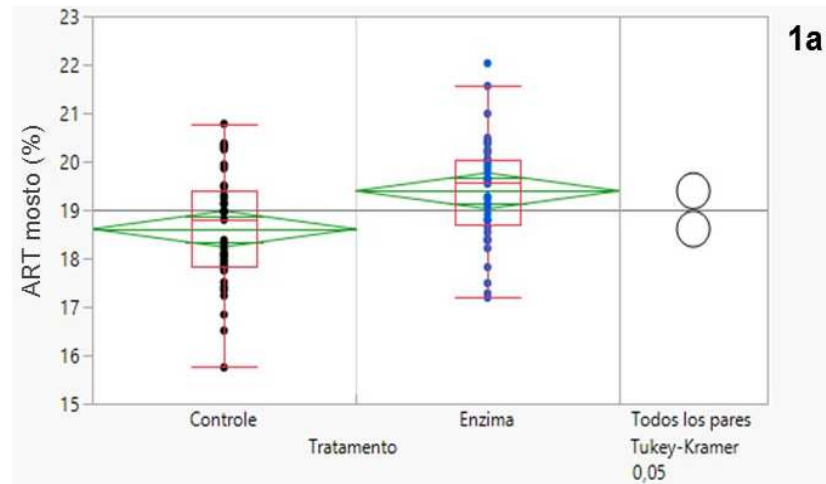
Teor alcoólico no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Temperatura no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (°C). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Potencial hidrogenóico do levedo tratado em processo industrial de produção de bioetanol (pH). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

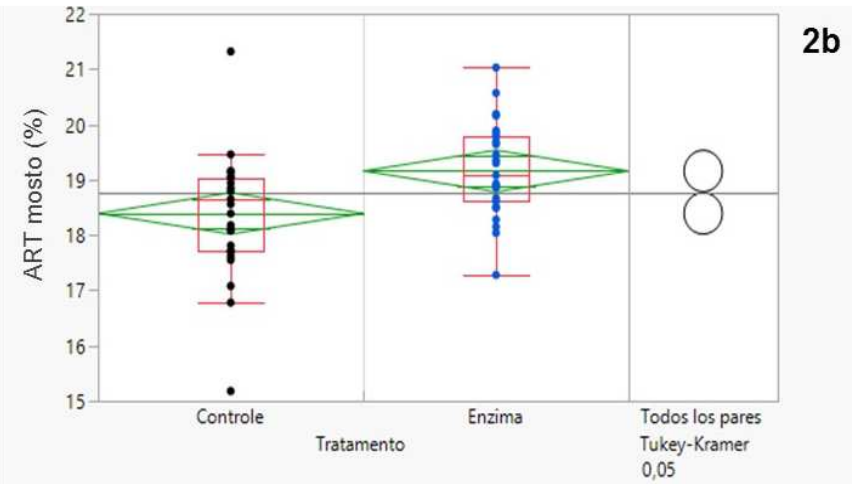
	Enzima	Controle
Enzima	-0,52411	0,26318
Controle	0,26318	-0,52411

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima A	19,394595
Controle B	18,607297

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Enzima	Controle
Enzima	-0,53041	0,23625
Controle	0,23625	-0,53041

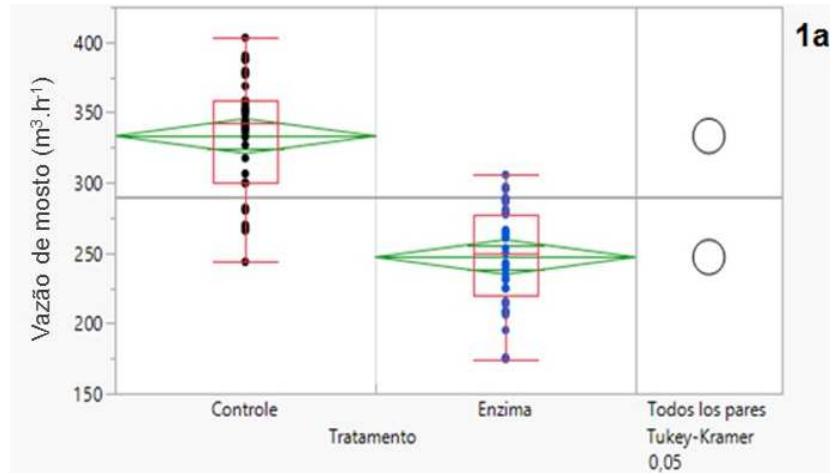
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima A	19,158889
Controle B	18,392222

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

ART do mosto em processo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

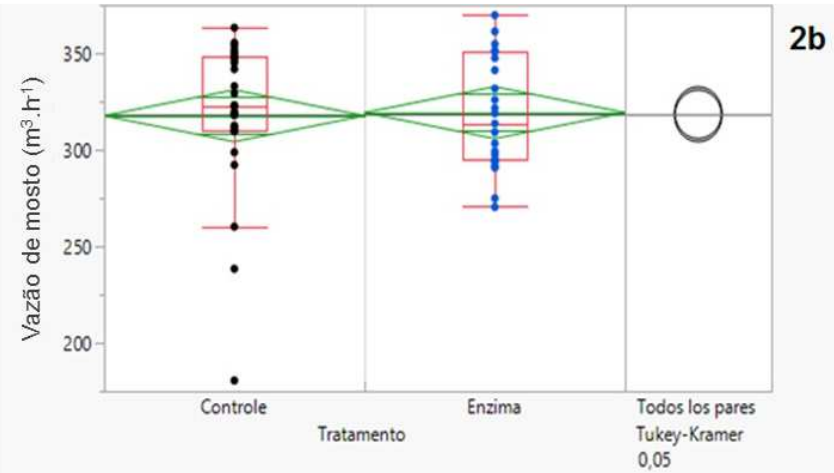
	Controle	Enzima
Controle	-17,473	68,674
Enzima	68,674	-17,473

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	333,23514
Enzima B	247,08811

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Enzima	Controle
Enzima	-19,005	-17,389
Controle	-17,389	-19,005

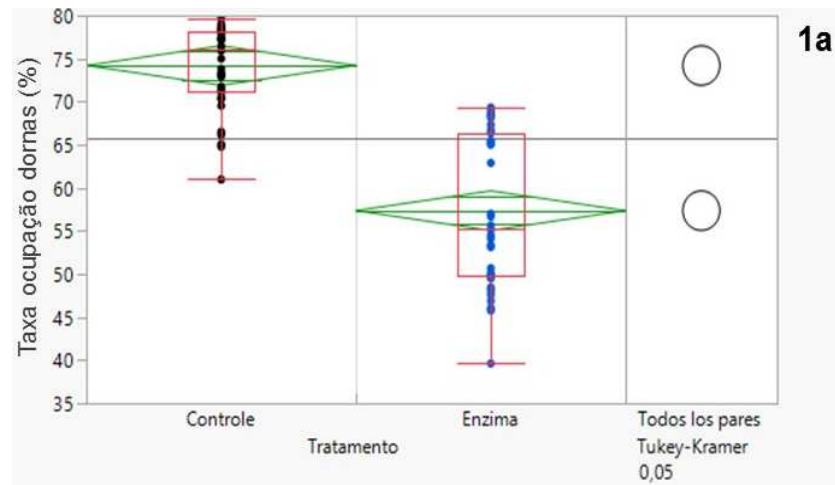
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima A	319,27630
Controle A	317,66074

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Vazão de mosto em processo industrial de produção de bioetanol ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

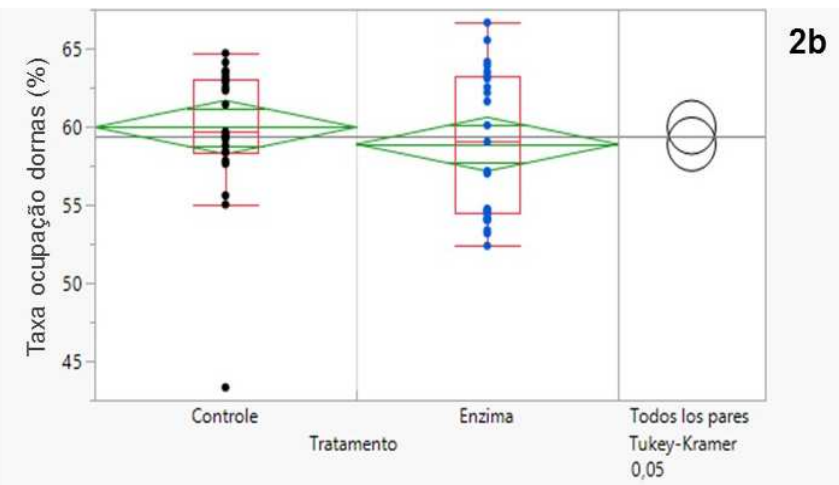
	Controle	Enzima
Controle	-3,253	13,582
Enzima	13,582	-3,253

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	74,202162
Enzima B	57,367568

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Controle	Enzima
Controle	-2,4285	-1,3444
Enzima	-1,3444	-2,4285

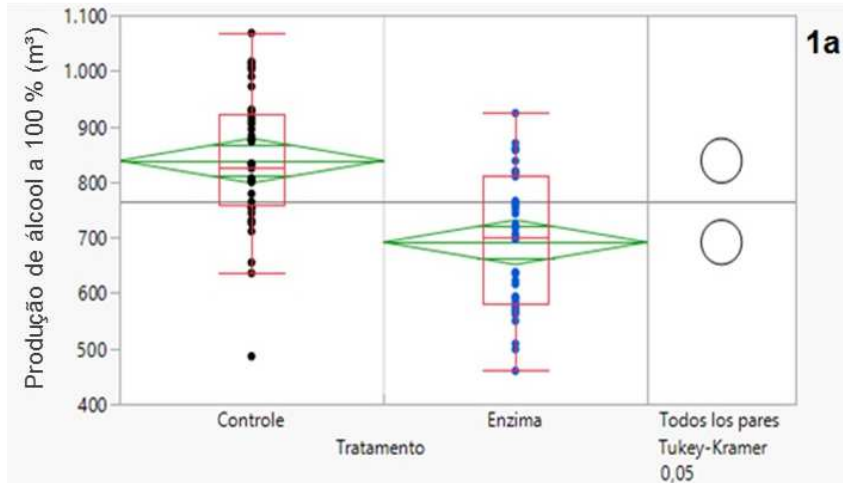
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	59,961481
Enzima A	58,877407

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Taxa de ocupação de dornas em processo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de *Tukey*, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

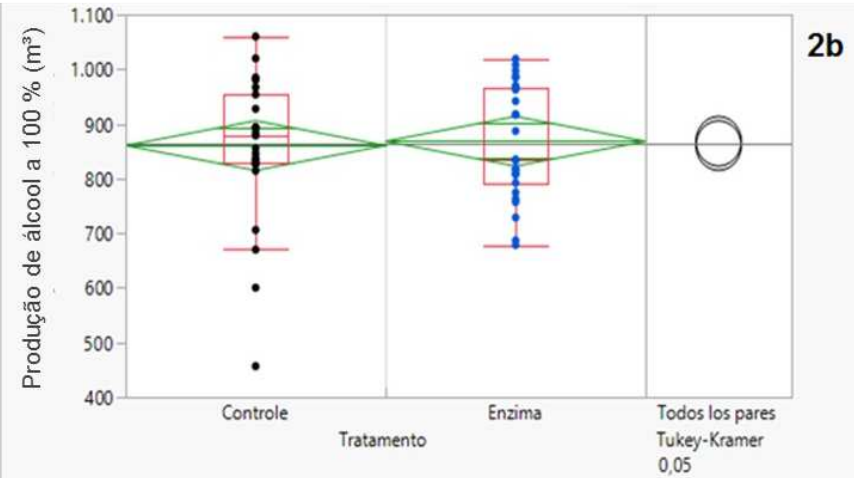
	Controle	Enzima
Controle	-56,683	90,182
Enzima	90,182	-56,683

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	838,35189
Enzima B	691,48649

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Enzima	Controle
Enzima	-64,292	-56,435
Controle	-56,435	-64,292

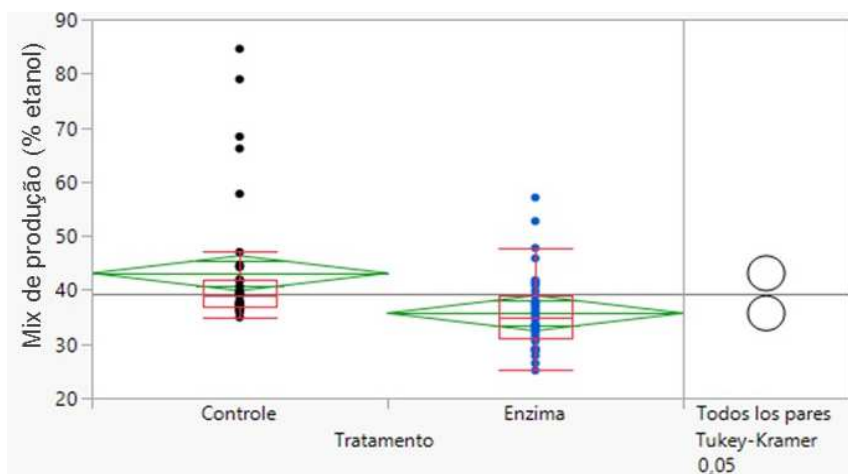
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima A	868,32889
Controle A	860,47259

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Produção de álcool convertido a 100% em processo industrial de produção de bioetanol (m³). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



1a

Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

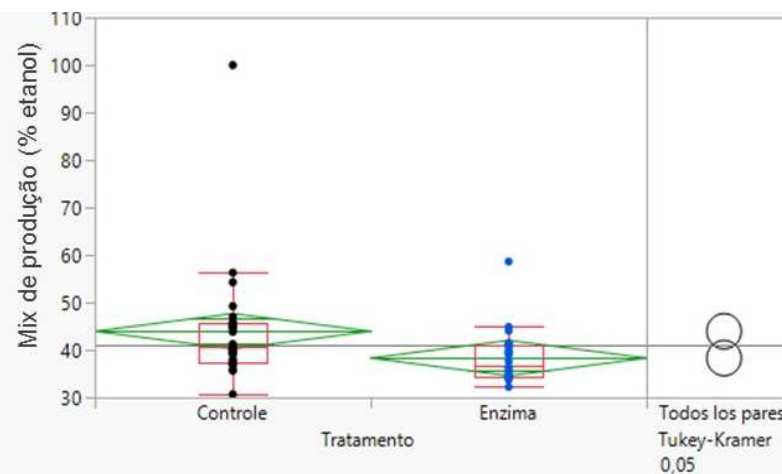
	Controle	Enzima
Controle	-4,5683	2,8217
Enzima	2,8217	-4,5683

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	43,087838
Enzima B	35,697838

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



2b

Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD

	Controle	Enzima
Controle	-5,2697	0,3781
Enzima	0,3781	-5,2697

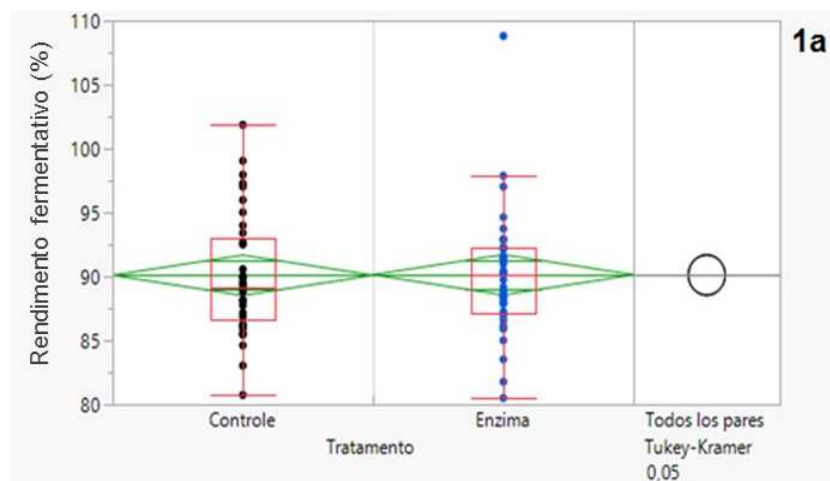
Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Controle A	43,951481
Enzima A	38,303704

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Mix de produção de etanol em processo industrial de produção de bioetanol (% etanol). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que os valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
1,99354	0,05

Matriz del umbral de HSD

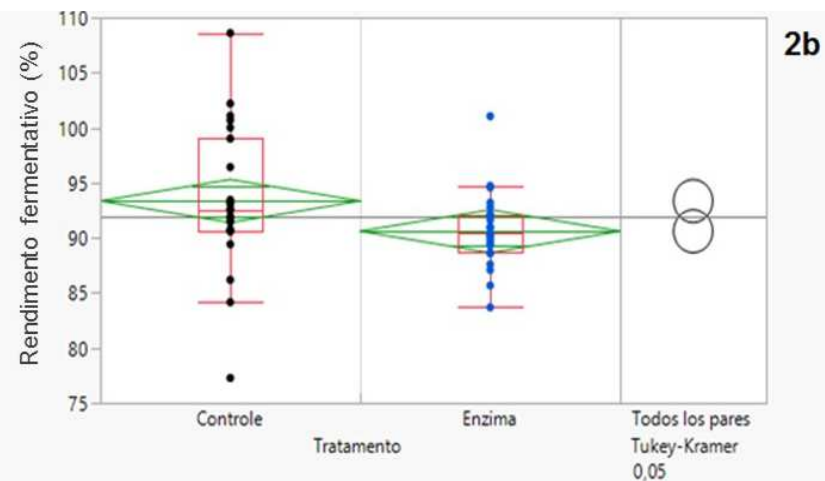
Abs. (Dif.) - HSD		Enzima	Control
Enzima	-2,2320	-2,1982	
Control	-2,1982	-2,2320	

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

Informe de letras de unión

Nivel	Media
Enzima A	90,133665
Control A	90,099838

Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.



Comparaciones de medias

Comparaciones para todos los pares mediante la prueba HSD de Tukey-Kramer

Cuantil de confianza

q*	Alpha
2,00669	0,05

Matriz del umbral de HSD

Abs. (Dif.) - HSD		Control	Enzima
Control	-2,7652	-0,0235	
Enzima	-0,0235	-2,7652	

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente distintas.

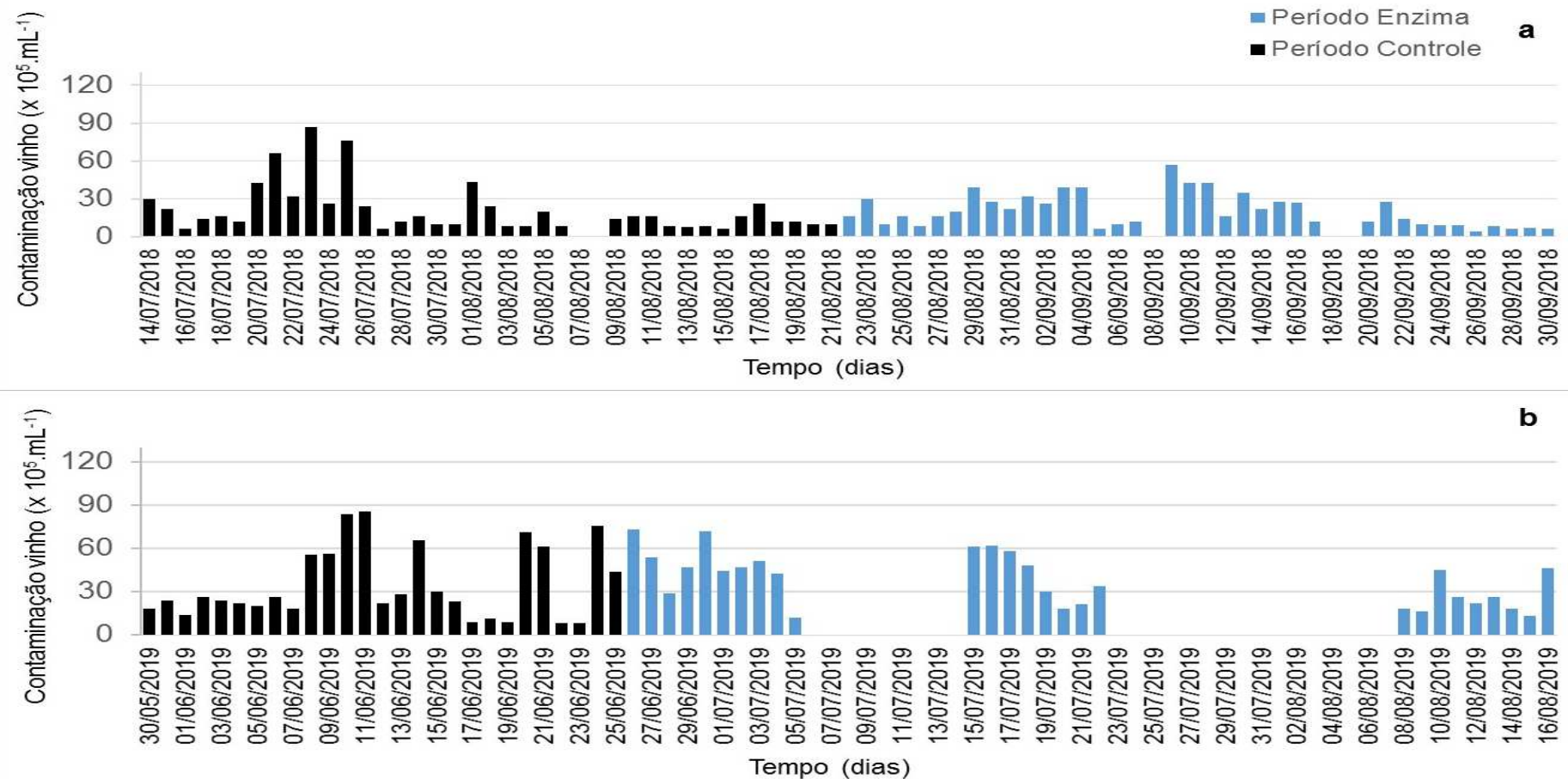
Informe de letras de unión

Nivel	Media
Control A	93,347478
Enzima A	90,605811

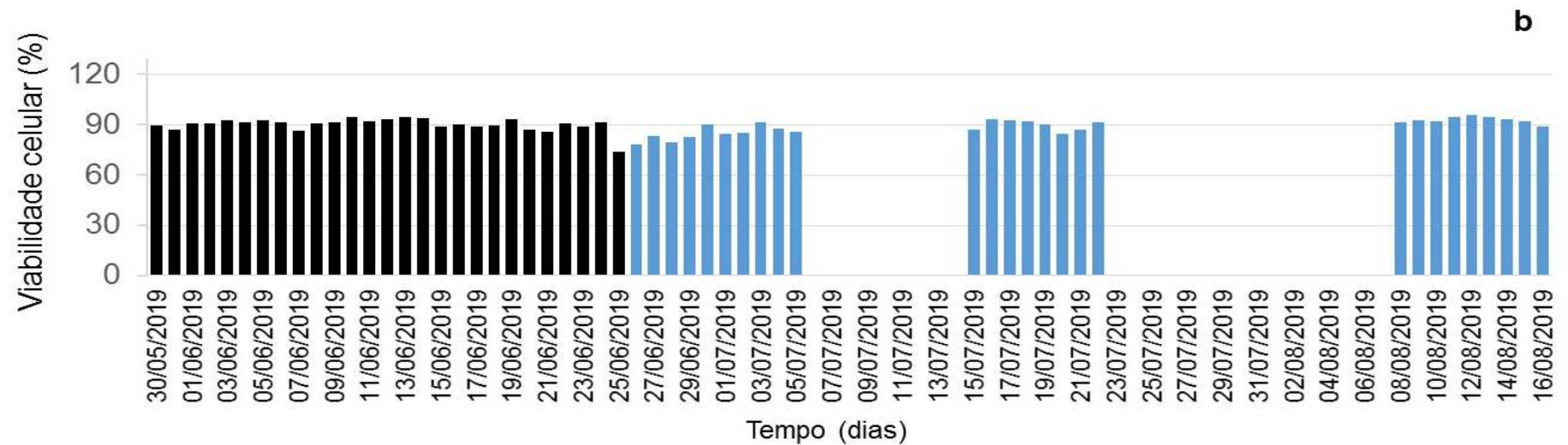
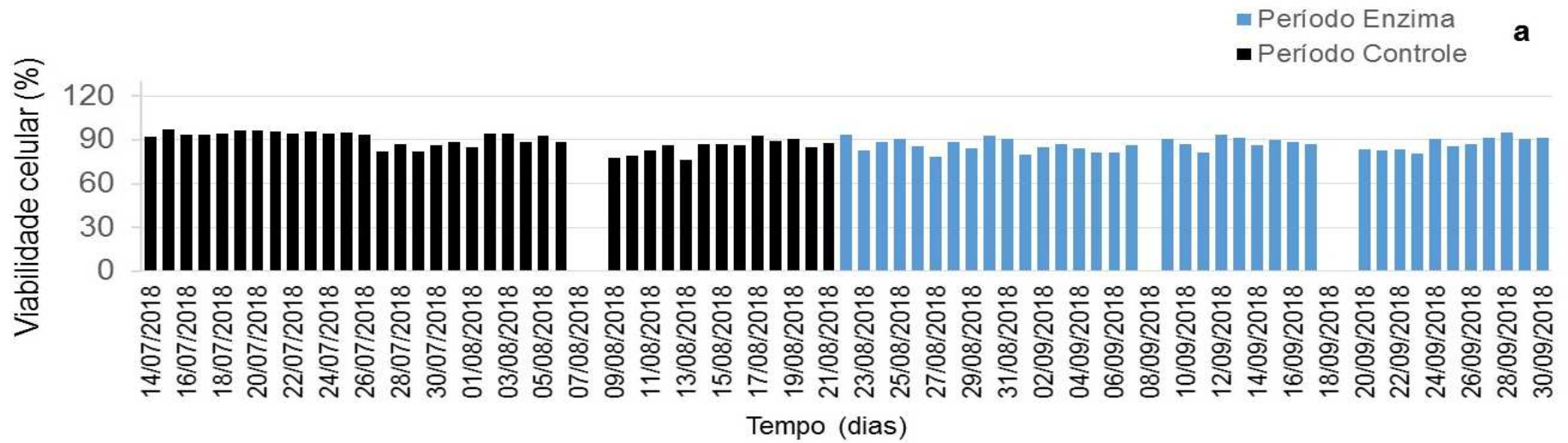
Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.

Rendimiento do processo fermentativo industrial de produção de bioetanol (%). (1a) Ensaio 1. (2b) Ensaio 2. (A) e (B) representam o Teste de Tukey, sendo que valores seguidos de mesma letra não apresentam diferença estatística.

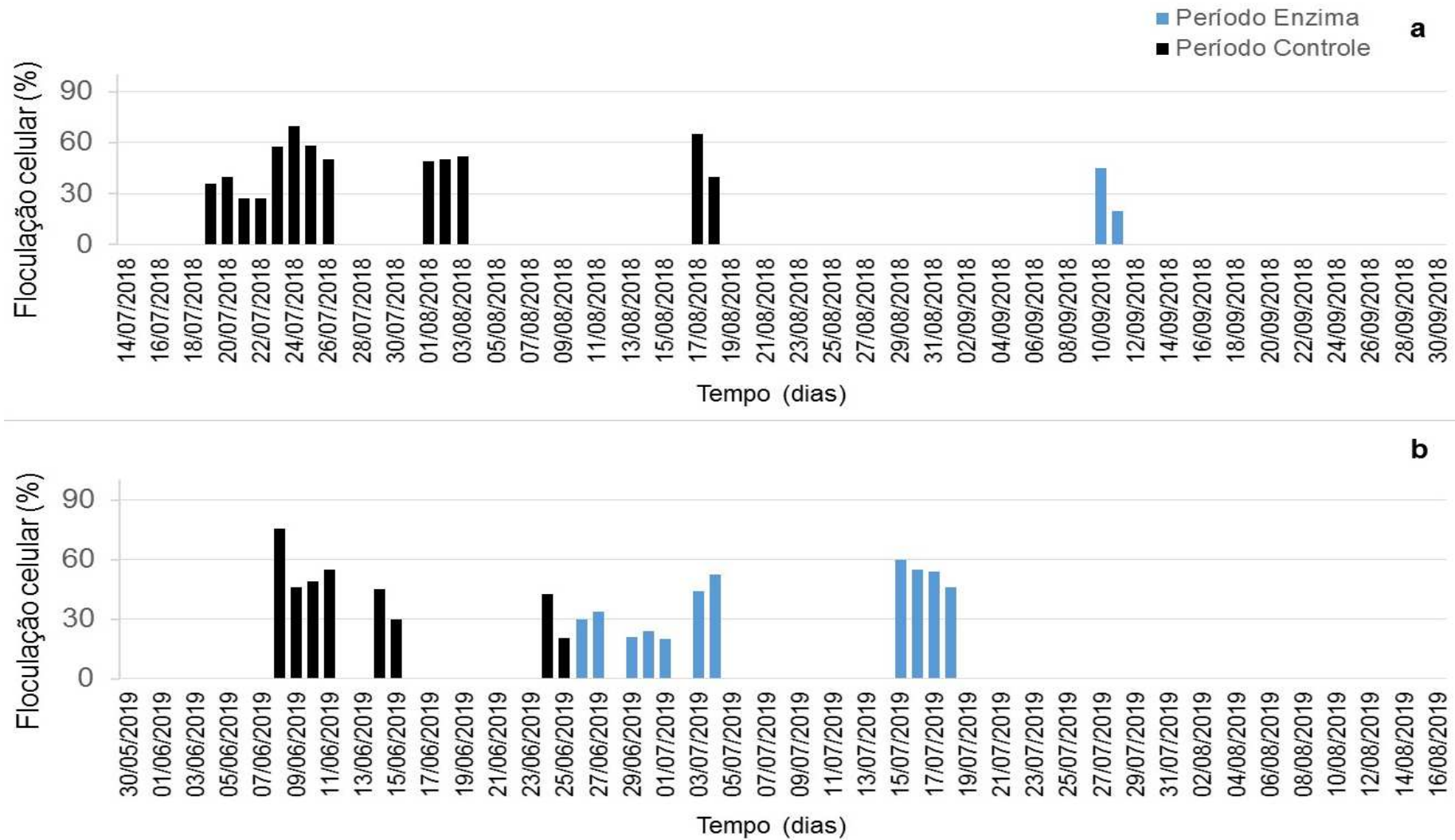
APÊNDICE D. GRÁFICOS REFERENTES À TABELA 5. VARIÁVEIS DO PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL



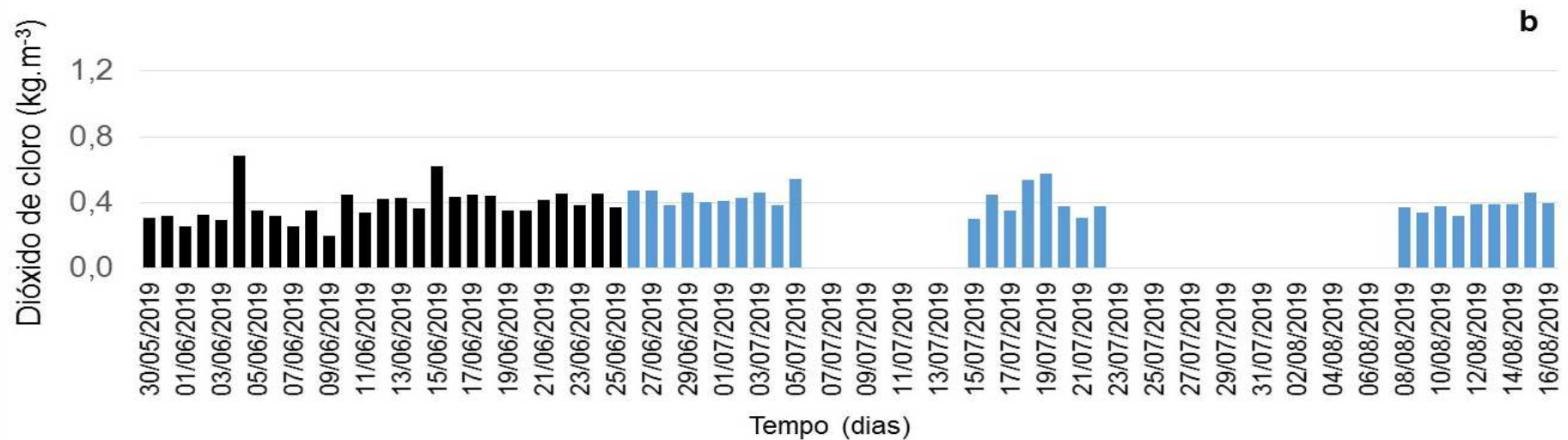
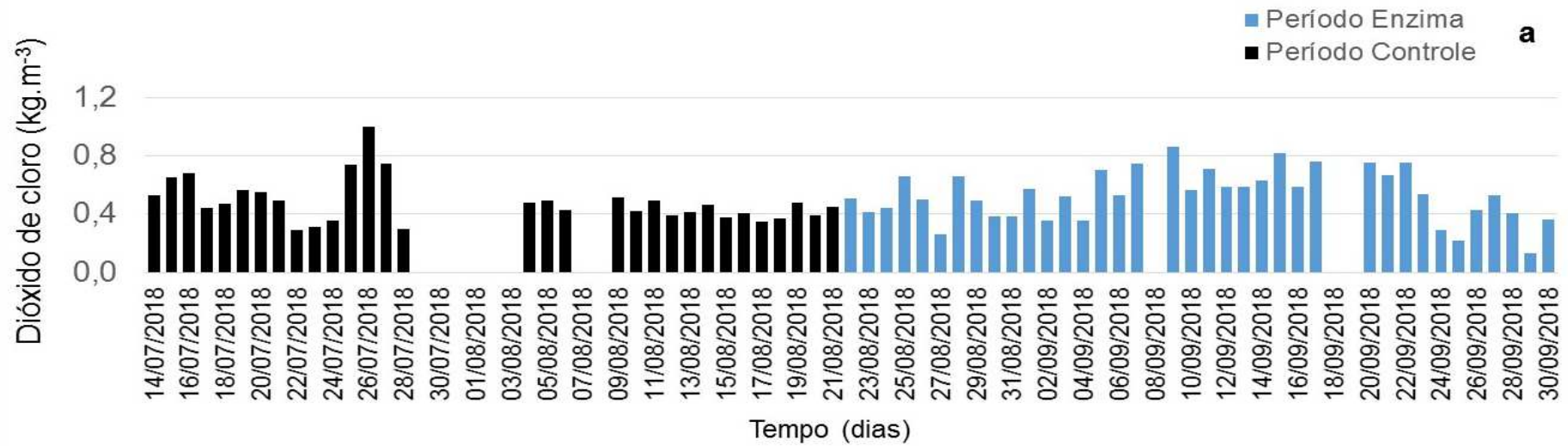
Nível de contaminação bacteriana no vinho em processo industrial de produção de bioetanol ($\times 10^5$ bastonetes por mL^{-1}). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



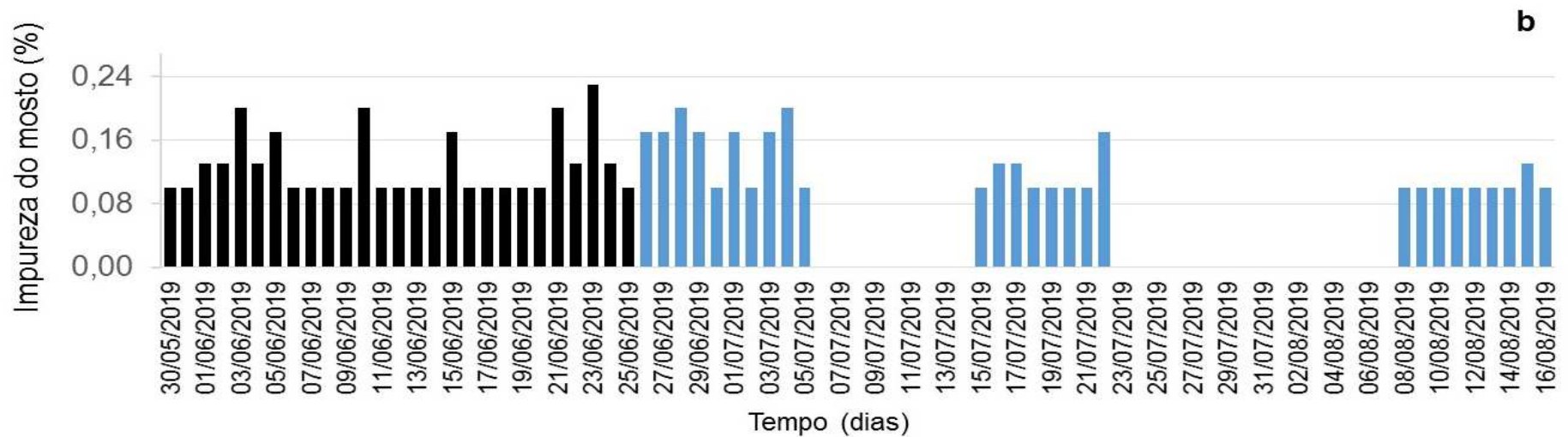
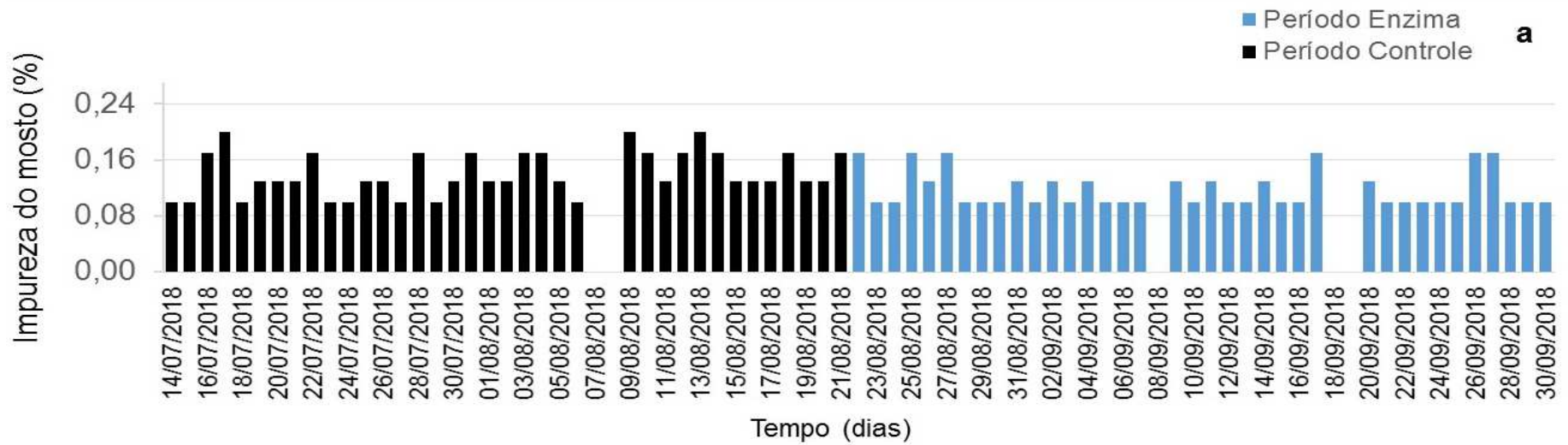
Viabilidade celular no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



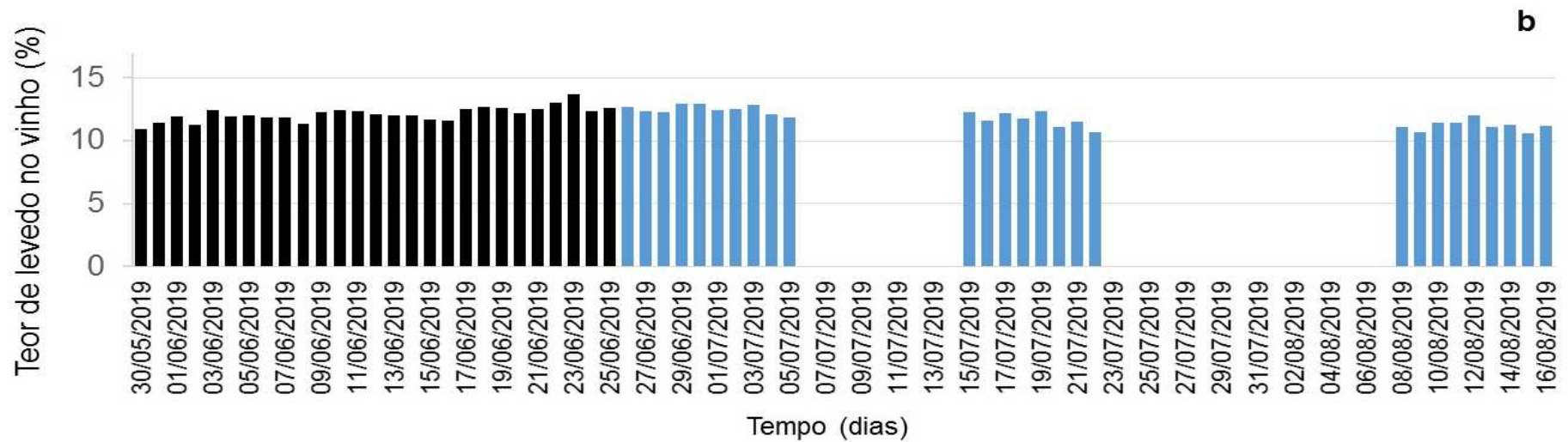
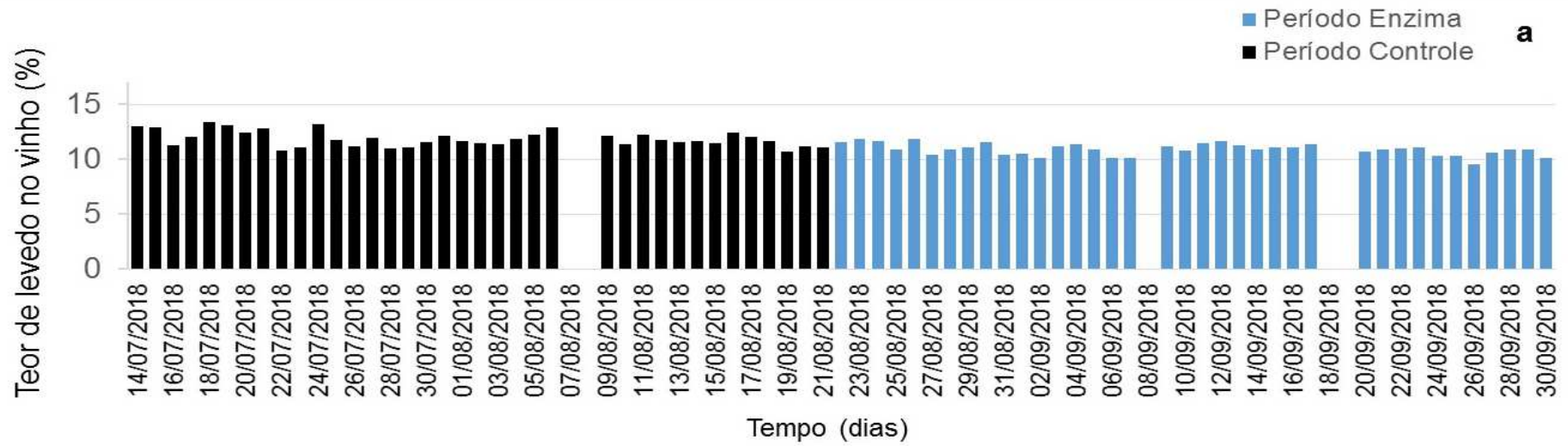
Floculação celular no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



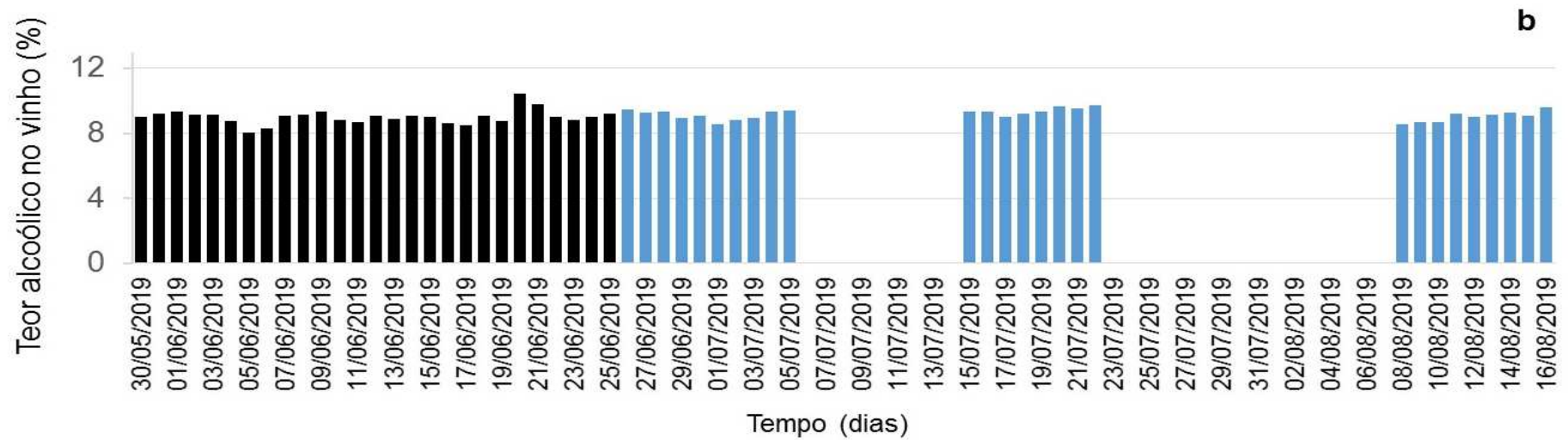
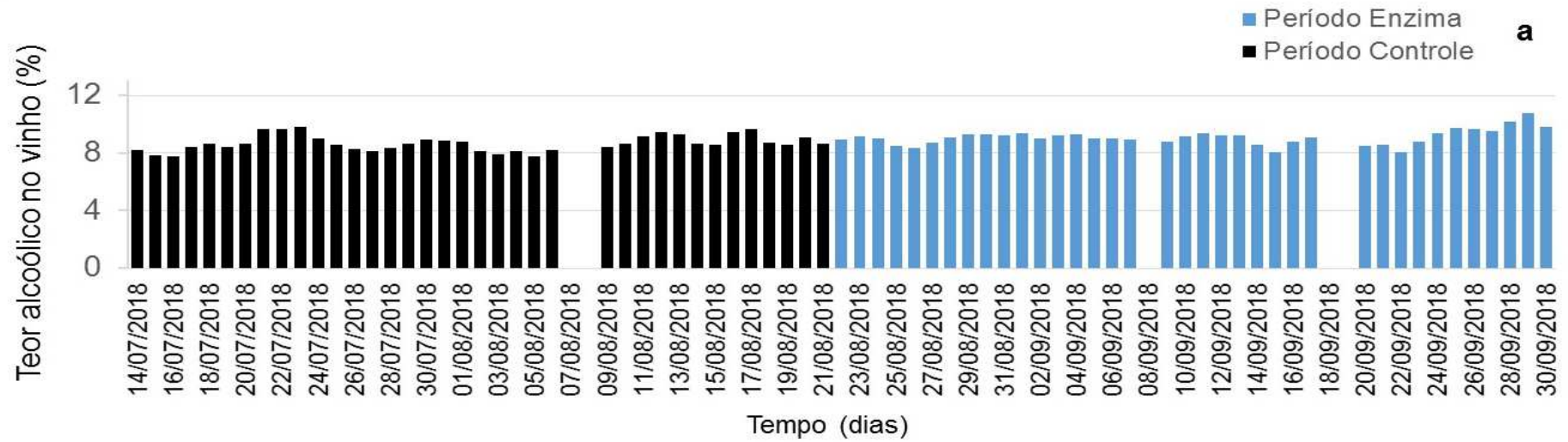
Consumo de dióxido de cloro em processo industrial de produção de bioetanol (quilograma de dióxido de cloro por metro cúbico de etanol, Rdc/e). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



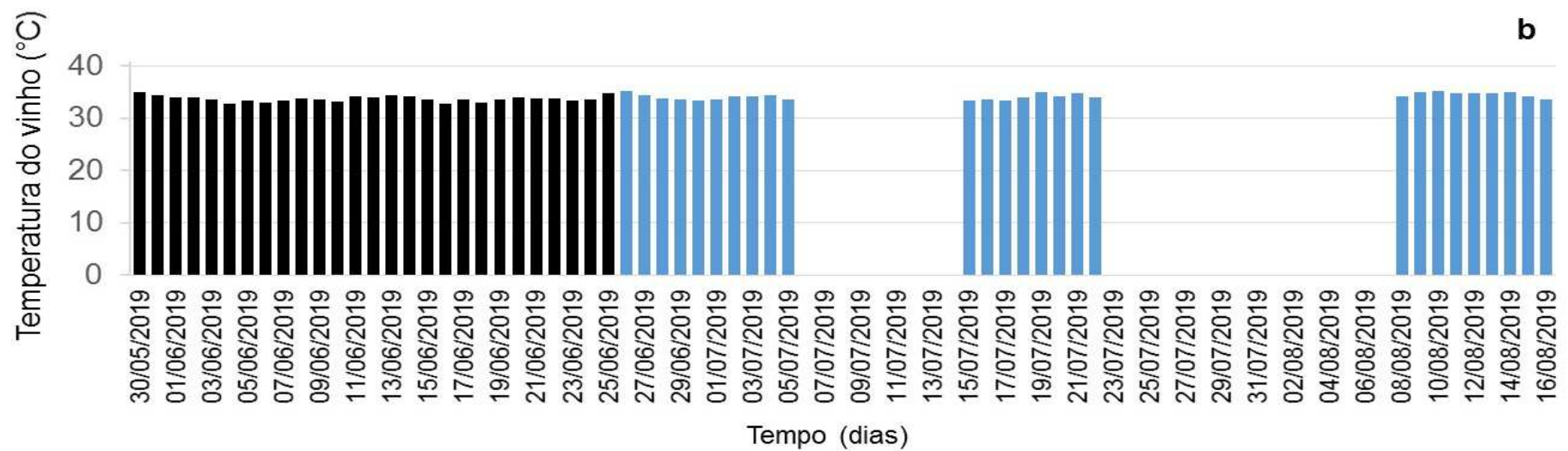
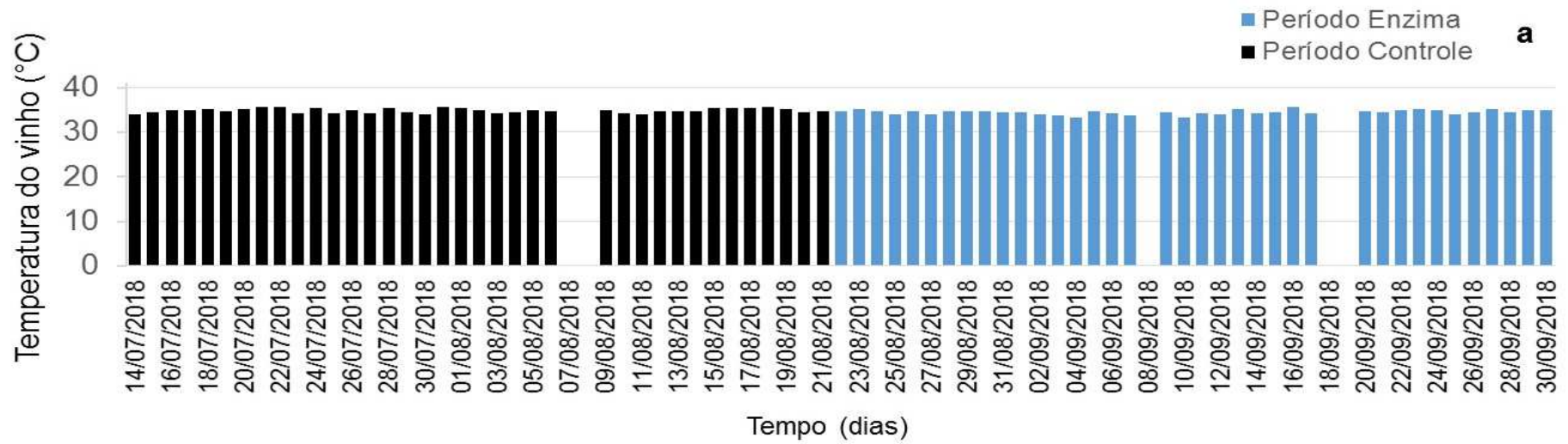
Impureza do mosto em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



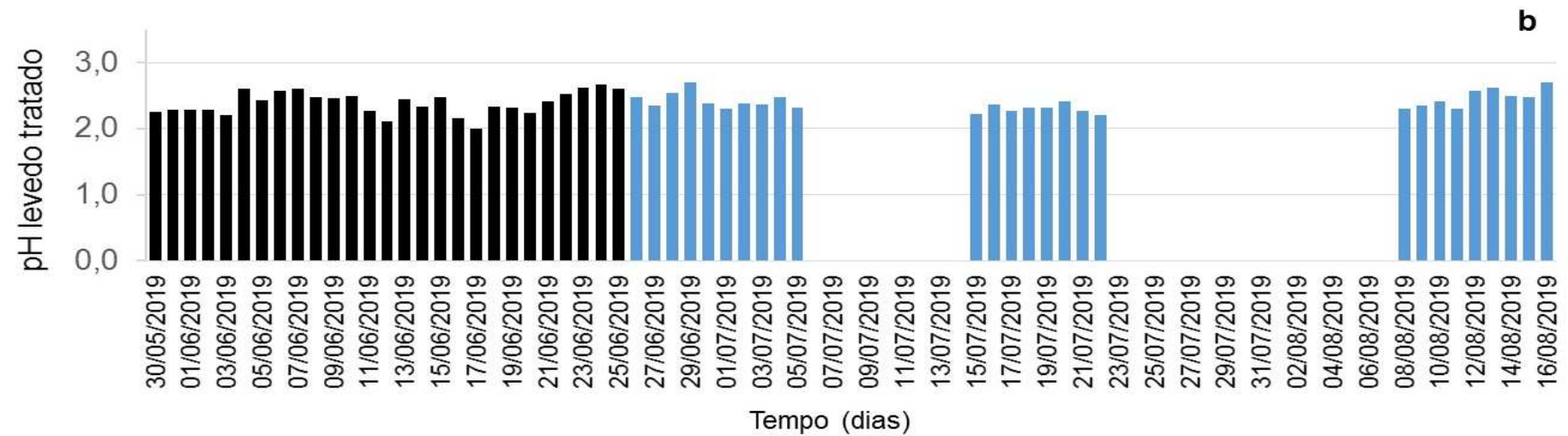
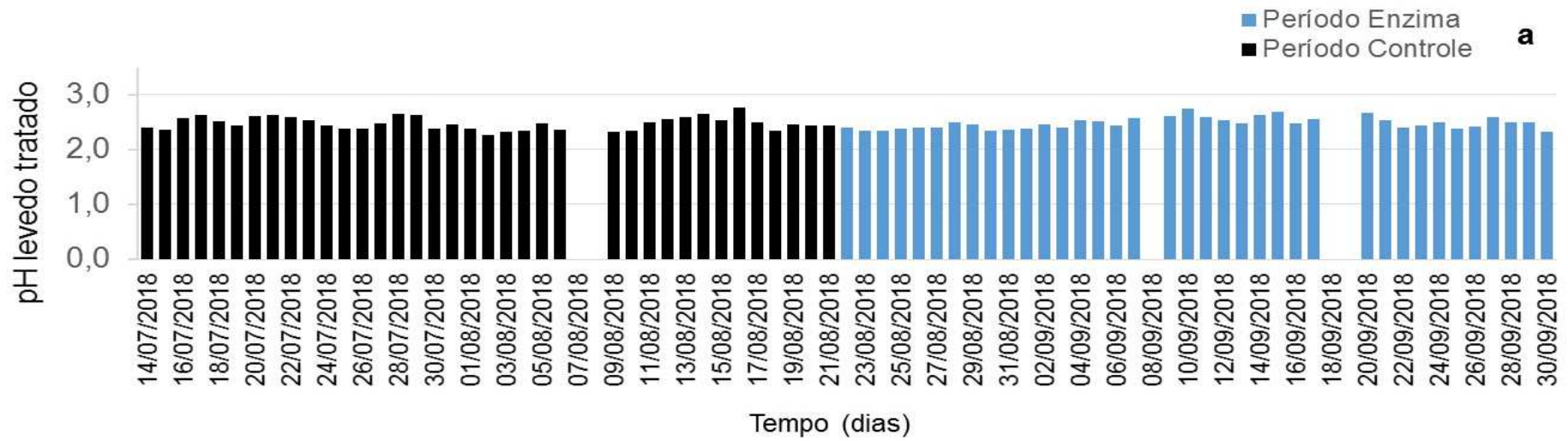
Teor de levedo no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



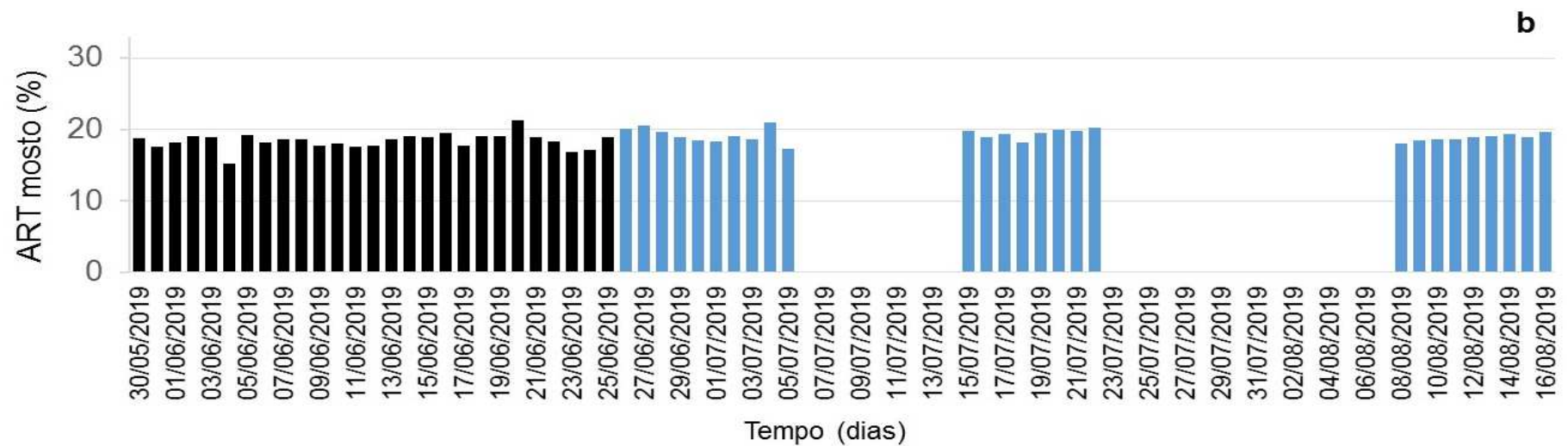
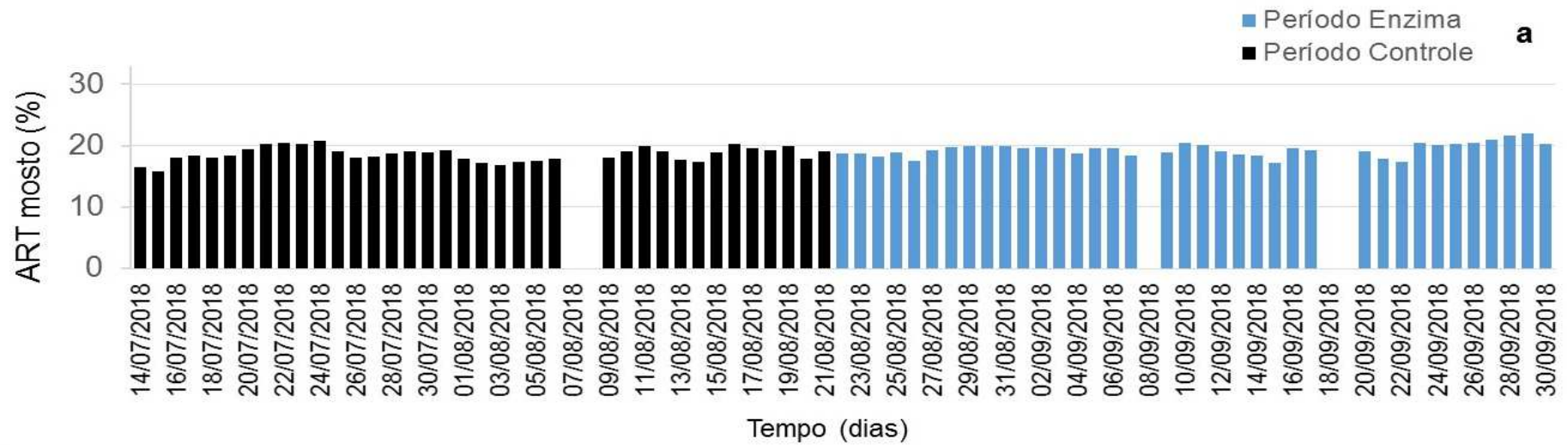
Teor alcoólico no vinho em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



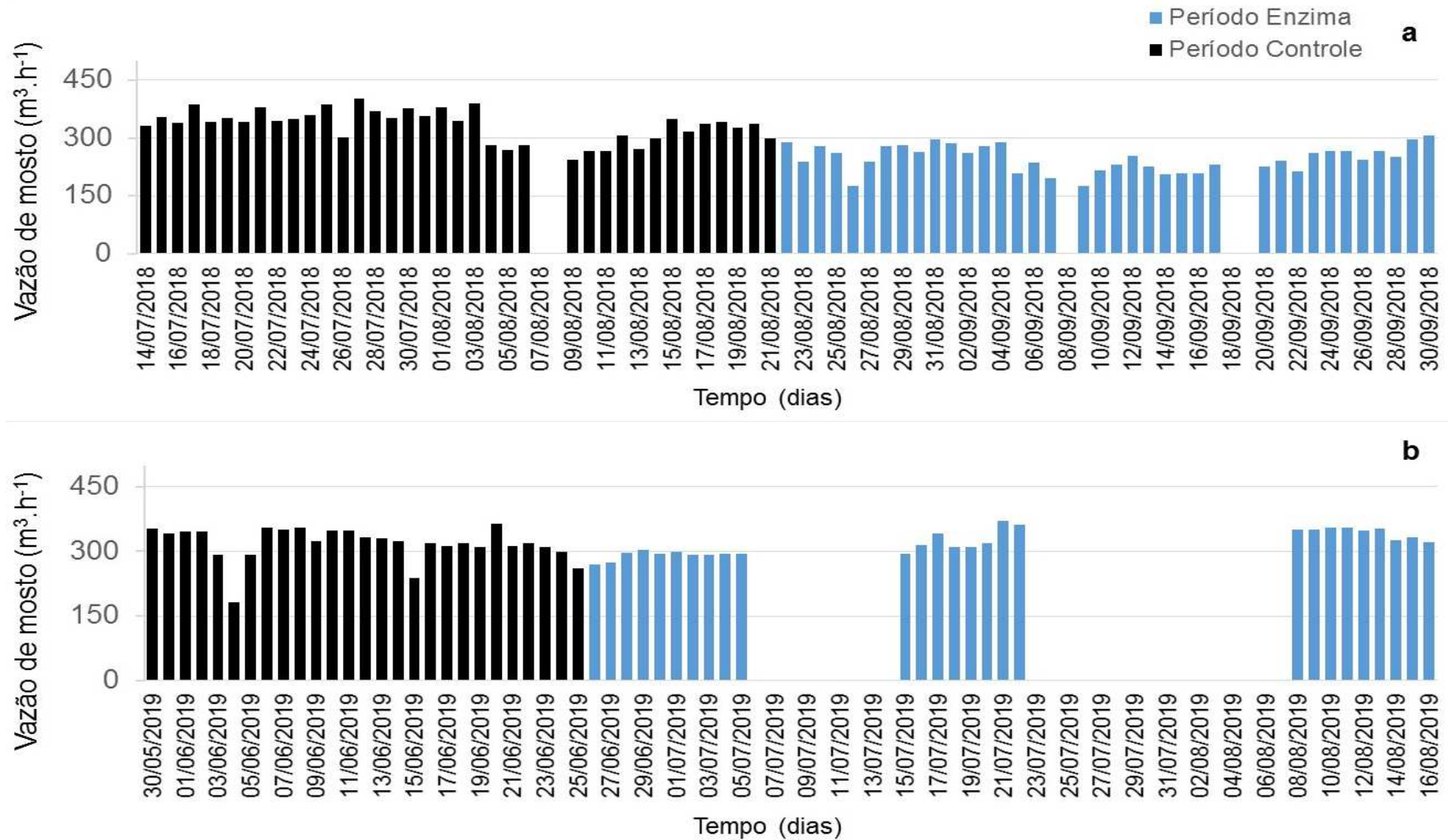
Temperatura do vinho em processo industrial de produção de bioetanol (°C). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



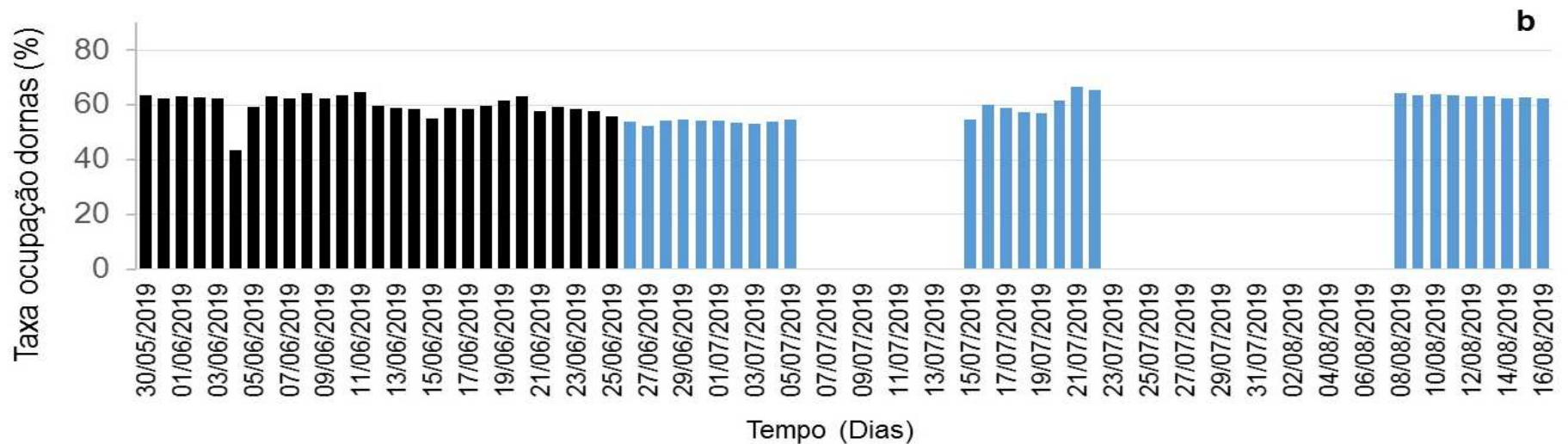
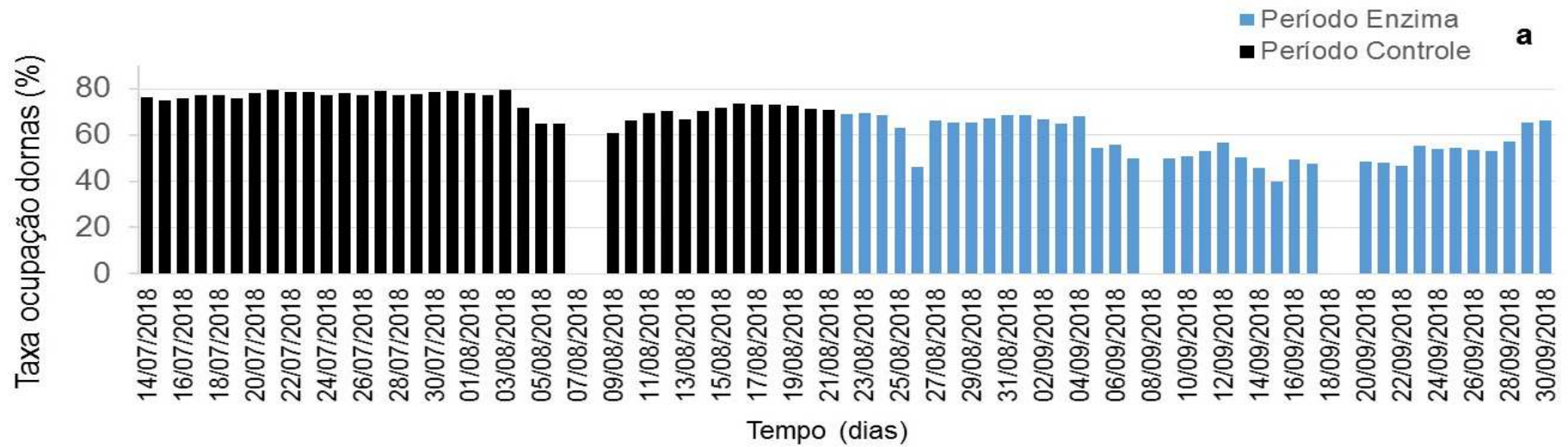
Potencial hidrogenóico (pH) do levedo tratado em processo industrial de produção de bioetanol (pH). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



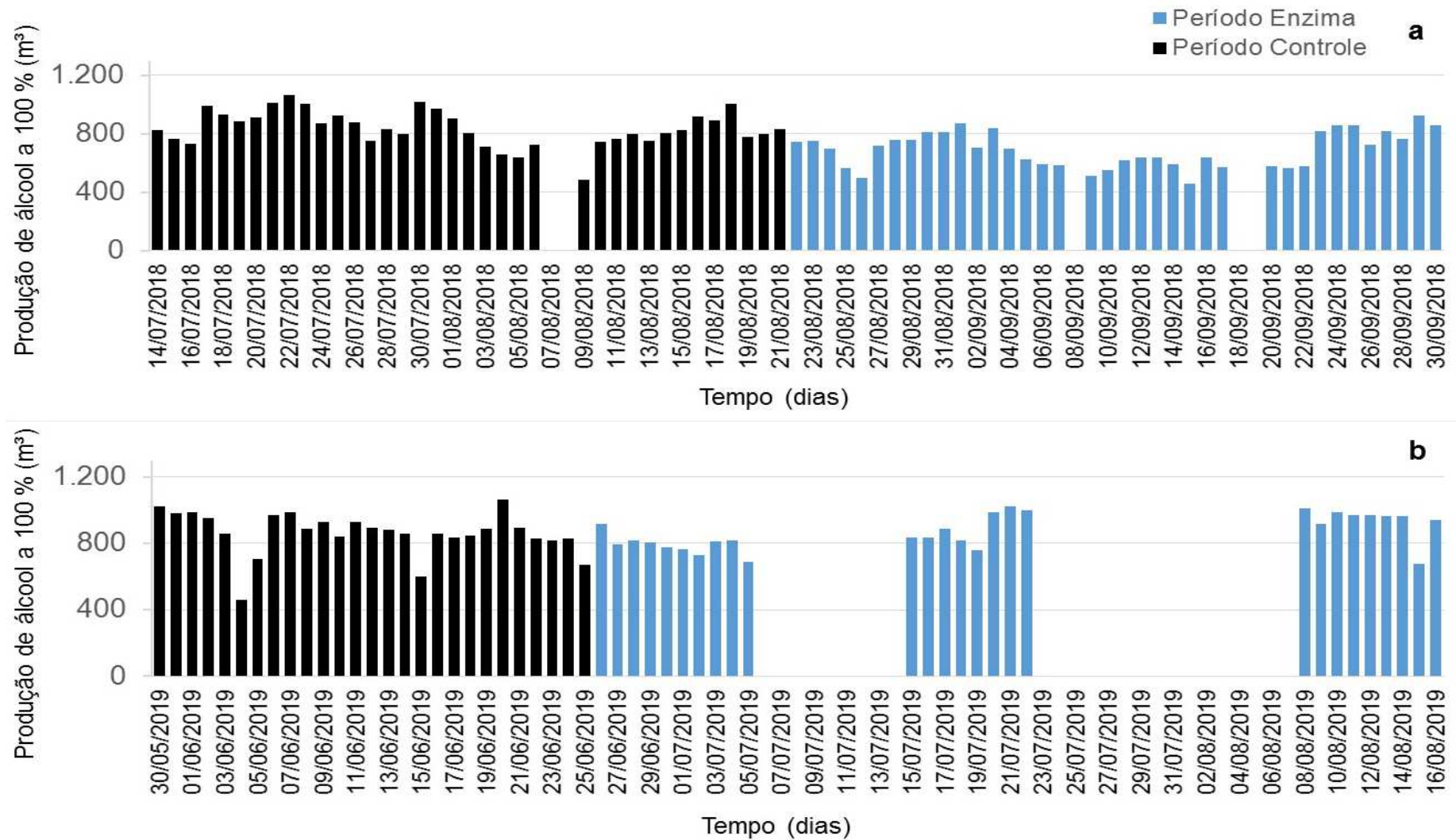
Açúcares redutores totais (ART) do mosto em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



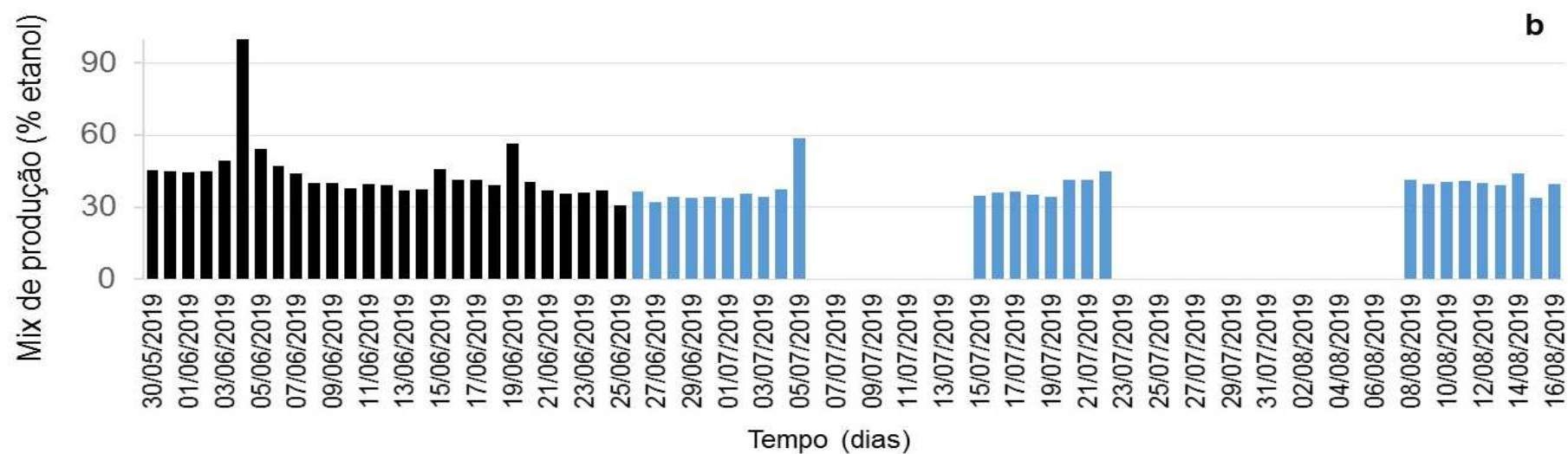
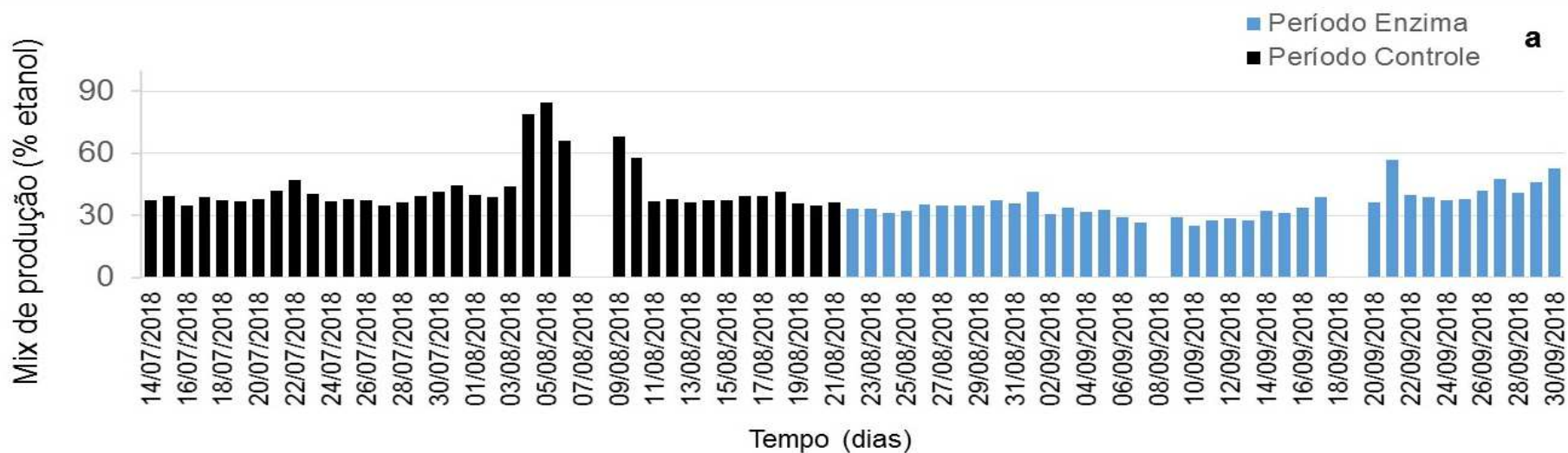
Vazão de mosto em processo industrial de produção de bioetanol ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



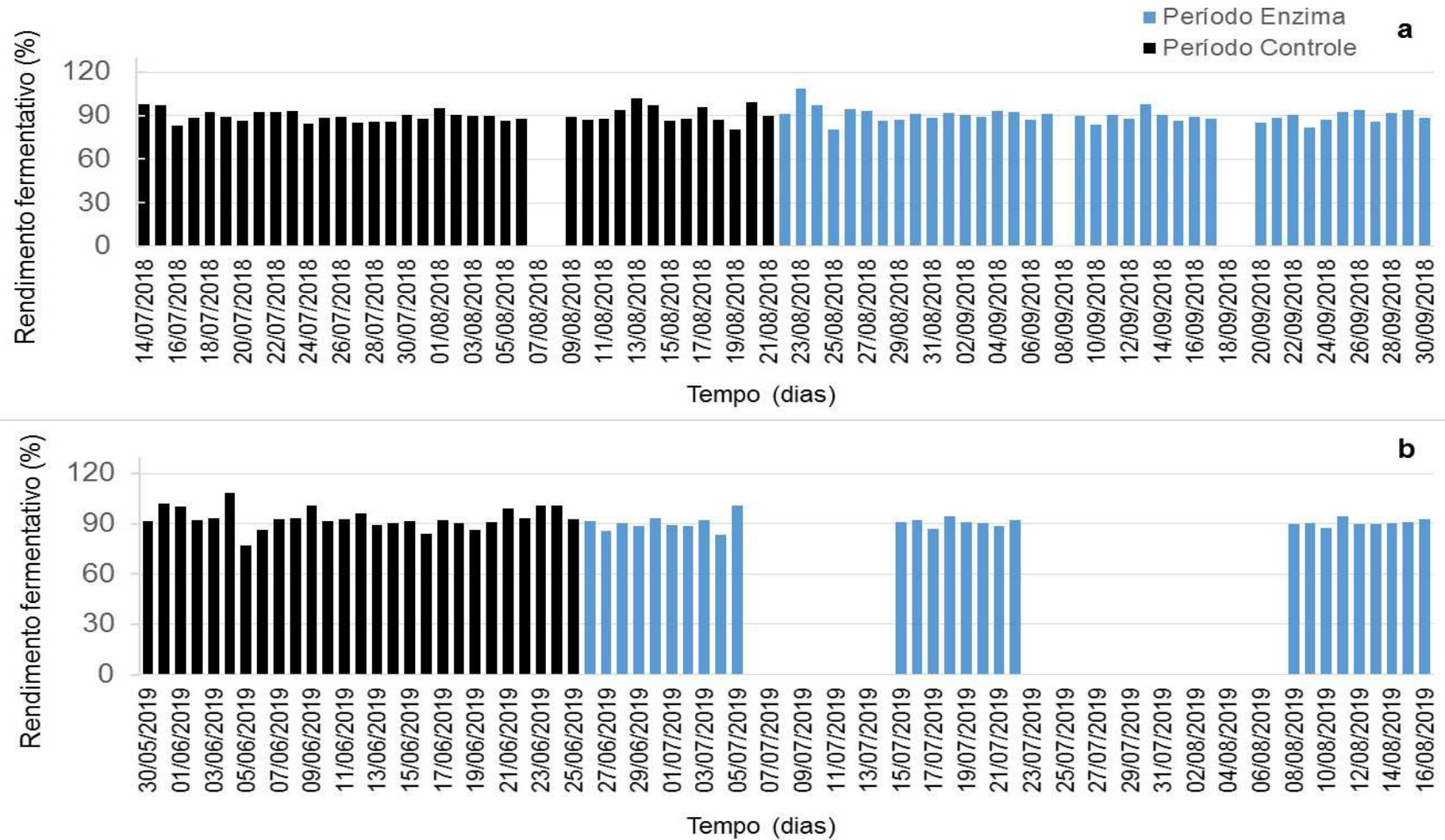
Taxa de ocupação de dornas em processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



Produção de álcool convertido a 100% em processo industrial de produção de bioetanol (m³). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



Mix de produção de álcool em processo industrial de produção de bioetanol (% etanol). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.



Rendimento do processo industrial de produção de bioetanol (%). (a) Ensaio 1. (b) Ensaio 2.