



**Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"**

CRISTINA REZENDE SILVA NONATO

**REDUÇÃO DE GLICEROL ENZIMÁTICO PRESENTE NA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM AUXÍLIO DE LEVEDURAS MODIFICADAS
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL.**

Assis/SP

2021

CRISTINA REZENDE SILVA NONATO

**REDUÇÃO DE GLICEROL ENZIMÁTICO PRESENTE NA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM AUXÍLIO DE LEVEDURAS MODIFICADAS
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis — IMESA e a Fundação Educacional do Município de Assis — FEMA, como requisito parcial à obtenção do Certificado de Conclusão.

Orientador: Gilcelene Bruzon

Assis/SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

NONATO, Cristina Rezende Silva.

Redução de glicerol enzimático presente no fermento com auxílio de leveduras modificadas para produção de etanol

Cristina Rezende Silva Nonato. Fundação Educacional do Município de Assis –FEMA – Assis, 2021.

36 páginas.

Trabalho de conclusão do curso (Química Industrial).

Orientador: Gilcelene Bruzon

1. Fermentação. 2. Levedura. 3. Glicerol. 4. Destilação

CDD:

Biblioteca da FEMA

**REDUÇÃO DE GLICEROL ENZIMÁTICO PRESENTE NA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM AUXÍLIO DE LEVEDURAS MODIFICADAS
PARA PRODUÇÃO DE ETANOL.**

CRISTINA REZENDE SILVA NONATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto Municipal de Ensino Superior de
Assis, como requisito do Curso de Graduação,
avaliado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Me. Gilcelene Bruzon

Examinador: Me. Alexandre Vinicius Guedes Mazalli

Assis/SP

2021

DEDICATÓRIA

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças para concluir este projeto. Aos meus pais Domingos e Maria, pilares da minha formação como ser humano. Ao meu marido Marcos Nonato por me incentivar e me ajudar todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Gilcelene Bruzon por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação.

Aos demais Mestres docentes do curso, pelas correções, exemplo e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.

Aos meus amigos do curso e trabalho que me incentivaram e inspiraram através de gestos, palavras e conhecimento a superar as dificuldades.

RESUMO

Diferentes linhagens de leveduras são utilizadas na produção de Etanol através da fermentação alcoólica, onde as leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol e gás carbônico. A maioria dos processos industriais de produção de álcool no Brasil utilizam o fermento em ciclos fermentativos consecutivos. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a utilização de leveduras modificadas no processo de produção do etanol brasileiro, pela redução na produção de glicerol durante a fermentação. Foi replicado em laboratório as condições industriais de fermentação para produção de etanol, incluindo: batelada alimentada por mosto composto por melaço obtido de uma usina local, reciclo de células por centrifugação e tratamento ácido. Em adição, condições de estresse foram testadas, incluindo: alta temperatura, alto brix do mosto e contaminação por levedura e bactéria. Primeiramente realizou-se um comparativo entre a levedura PE-02, mais amplamente utilizada no Brasil. A levedura demonstrou resistência a estresse, incluindo: alto brix do substrato, alta concentração de etanol no vinho, elevada temperatura e contaminação bacteriana e por leveduras selvagens. Assim, manteve ou excedeu a viabilidade e equipara a cinética fermentativa com a levedura convencional e aumentos de rendimentos e redução de glicerol.

Palavras-chave: Adição de leveduras, Fermentação, Glicerol, Etanol

ABSTRACT

The different strains of yeasts in the production of Ethanol through alcoholic fermentation where the yeasts convert the sugars present in the substrate into ethanol and carbon dioxide. The industrial processes of alcohol production in Brazil use yeast in consecutive fermentation cycles. The objective of this work was to demonstrate the use of modified yeasts and increase ethanol yields in the Brazilian production process by reducing glycerol production during fermentation. Industrial fermentation conditions for ethanol production were replicated in the laboratory, including: batch fed by must composed of molasses obtained from a local mill, cell recycling by centrifugation and acid treatment. In addition, stress conditions were tested, including: high temperature, high wort brix and yeast and bacterial contamination. First compared with PE-02 yeast, the most widely used selected yeast strain in Brazil. The performance of the yeast mixture was compared with an industrial yeast by fermentation cycles. The purpose of this study was to introduce yeast and bacterial contamination to fermentation and to monitor population dynamics. The yeast demonstrated resistance to stress, including: high substrate brix, high ethanol concentration in wine, high temperature and bacterial and wild yeast contamination. Thus, it maintained or exceeded viability and equated fermentation kinetics with conventional yeast and yield increases and glycerol reduction.

Keywords: Addition Yeast, Fermentation, Glycerol, Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cana - de - açúcar	15
Figura 2: Fermentação da cana-de-açúcar durante a produção do etanol	15
Figura 3: Transformação da glicose em etanol e CO ₂	16
Figura 4: Hidrólise da sacarose.....	17
Figura 5: Fermentação Alcoólica.....	17
Figura 6: <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> 2P2	18
Figura 7: Fermentação batelada.....	20
Figura 8: Trocador de calor a placas	20
Figura 9: Dornas fechadas	21
Figura 10 : Representação de Haworth para Trehalose	22
Figura 11: Reagente solução padrão enzimático.....	25
Figura 12: Amostras de fermento e mosto.....	26
Figura 13: Amostras de fermento em estufa á 36 °C	27
Figura 14: Centrífuga de tubos	29
Figura 15: Tubos de ensaio com amostras de Glicerol	30
Figura 16: Gráfico com dados de Glicerol	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados do teste de fermentações com estresse Térmico	28
Tabela 2: Dados em rendimentos de Etanol no vinho e Glicerol	31
Tabela 3: Resultados de Glicerol	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATÉRIA PRIMA	15
3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	16
4. LEVEDURAS.....	18
4.1 Leveduras da Cana de Açúcar.....	19
4.2 Leveduras modificadas	19
5. FERMENTAÇÃO BATELADA	20
6. GLICEROL ENZIMÁTICO	22
7. DESTILAÇÃO	23
8. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
8.1 Equipamentos:	24
8.2 Insumos:.....	24
8.3 Procedimento analítico para análise de Glicerol	25
8.3.1 Método enzimático.....	25
8.3.2 Determinação	25
9. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
9.1 Amostras de Fermento e Mosto:	26
9.2 Fermentação:	27
9.3 Centrifugação:	28
9.4 Análise de Glicerol:	29
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
10.1 Resultado dos testes em laboratório:.....	31
10.1.1 Fechamento do balanço de massa	31
10.1.2 Glicerol durante o período de teste	31
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

O Objetivo deste trabalho foi demonstrar em escala de testes laboratoriais a eficiência e performance em redução de glicerol da levedura *Saccharomyces Cerevisiae* e da levedura modificada.

A levedura comum é um fungo composto de minúsculas células tipo vegetais similares às bactérias. Suas enzimas invertase e zimase quebram açúcar em álcool e gás carbônico (Jeov,2014).

Aliadas às características morfológicas, as capacidades de assimilação e fermentação de determinados de carboidratos podem ser utilizadas na classificação de espécies de leveduras. A *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta cerca de 35% de matéria seca, da qual 10% é representada pela trealose, 12% pelo glicogênio, 8% por glucana e 6% por manana (VIEIRA, 2011).

Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar produtos secundários da fermentação. No início da safra de cana de açúcar é necessário estimular o processo da formação de massa celular, em perca da produção de etanol. Para se obter rapidamente a quantidade de fermento nas dornas, porém, o aumento dessa massa não é desejável, pois reduz a eficiência da fermentação alcoólica (MENDES, 2014).

A produção de glicerol, ácidos orgânicos reduzem a formação de etanol é ajudam a reduzir a qualidade do produto destilado (PEITER, 2016)

Nos últimos anos vem sendo registrado o aparecimento de levedura selvagem que contaminam os nêculos industriais em variadas proporções, inclusive aumentando quantitativamente as leveduras utilizadas no início da safra (MOREIRA *et. al.* ,2013)

Entre os vários compostos derivados a partir da biomassa que têm sido propostos como matéria-prima para a produção de substâncias químicas, o glicerol é de interesse especial porque é produzido em grandes quantidades, como um coproduto durante a produção de biodiesel por meio de transesterificação (PEITER, 2016)

O processo de formação de glicerol por levedura está diretamente correlacionado com o balanço de redox da célula. Oura (1977 *apud* GUTIERREZ, 1991), relatou que a formação do ácido succínico acarreta maior produção de NADH

e, portanto, aumentando o glicerol formado, Nordstrom (1966, *apud* GUTIERREZ, 1991) verificou que a biossíntese do material celular é um processo que produz NADH e assim também contribui para a formação de glicerol. Em condições normais o glicerol é liberado para o meio para o meio extracelular, porém em condição de stress osmótico acumula – se no citoplasma. O glicerol se acumula no meio intracelular devido ao aumento de sua síntese, retenção pela membrana plasmática ou absorção a partir do meio extracelular (MELO,2006).

2. MATÉRIA PRIMA

A partir da cana de açúcar (figura 1) obtem-se o melaço, o qual é utilizado para o preparo do mosto. Na fermentação (figura 2), utiliza-se água para diluição e ajuste do brix. Durante a transformação das matérias primas fermentescíveis, há a produção de outras substâncias que não correspondem ao produto desejado, reduzindo o rendimento e a produtividade do processo. Asr substâncias nem sempre desejáveis, as temperaturas elevadas do mosto ocasionam aumento da proliferação bacteriana; redução da viabilidade celular; queda no rendimento fermentativo, probabilidade maior de floculação (TELEKEN, 2017). Alguns cuidados tendem se a ser tomados com o preparo do mosto como, concentração de açúcares totais , Acidez total, pH e suplementação com nutrientes.



Figura 1: Cana – de – Açúcar (Joseph Mucira | Pixabay, 2021).



Figura 2: Fermentação da cana-de-açúcar durante a produção do etanol (Joseph Mucira | Pixabay, 2021).

3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um processo catabólico anaeróbico em que há a degradação de moléculas de açúcar, no interior das células de micro-organismo, até a formação de etanol e CO₂, havendo liberação de energia química e térmica. As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa (VOLPE, 1997). O termo fermentação vem do latim “fervere” (ferver) onde entende-se um conjunto de reações bioquímicas provocadas por microrganismos que atacam os açúcares (glicose e frutose) do mosto transformando em álcool etílico e gás carbônico.

Para uma melhor fermentação, o mosto (líquido açucarado) deve ser adicionado de modo contínuo nas dornas, sendo que sua quantidade deve ser controlada através da concentração do fermento. Após a adição do mosto ao fermento, a fermentação se divide em 3 fases: a intermediária, onde as leveduras degradam os monossacarídeos eliminando o CO₂ favorecendo a multiplicação, a tumultuosa onde ocorre intensa liberação de CO₂ e a final, onde a quantidade de álcool atinge 10% do volume total, há intoxicação da levedura, finalizando a produção (CARRER, 2013).

As leveduras fermentam na ausência de oxigênio (anaerobiose), degradando parcialmente a glicose em etanol e dióxido de carbono. A levedura e outros microrganismos fermentam a glicose em etanol e CO₂, a glicose é convertida em piruvato pela glicólise e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo de dois processos, conforme representa a figura 3 e conforme equação na figura 4 e figura 5.

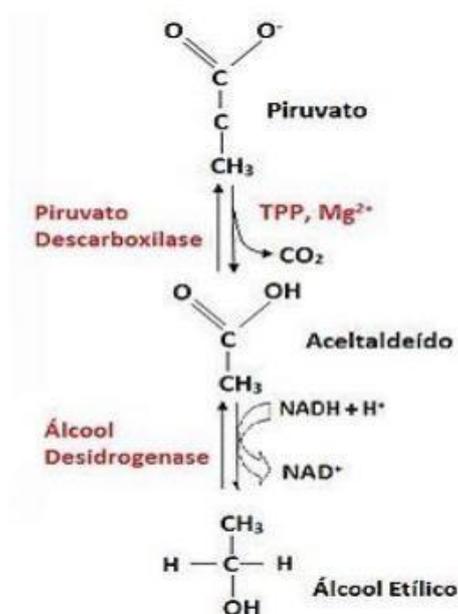


Figura 3: Transformação da glicose em etanol e CO₂ (ALMEIDA, 2015).

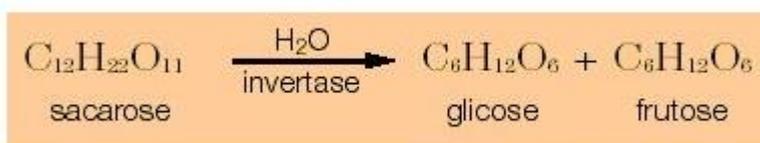


Figura 4: Hidrólise da sacarose (Infoescola.2018)

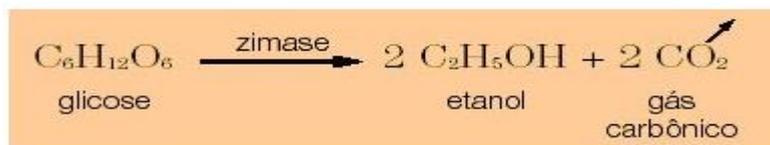


Figura 5: Fermentação Alcoólica (Infoescola,2018)

No primeiro passo, o piruvato sofre uma reação de descarboxilação catalisada pela piruvato descarboxilase. A piruvato descarboxilase necessita de Mg²⁺ pois tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato. No segundo passo, através da ação do álcool desidrogenase, há a redução do acetaldeído a etanol, com a NADH, derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (ALMEIDA, 2015).

4. LEVEDURAS

As leveduras (pertencentes ao grupo dos fungos) são organismos eucarióticos unicelulares que existem no solo, ar, plantas, frutos e alimentos. A espécie mais comum é a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida vulgarmente como levedura de padeiro ou da cerveja. São conhecidas pelo seu papel milenar na produção de pão, vinho e cerveja, devido à sua capacidade de produzir álcool (principalmente o etanol, presente em bebidas fermentadas) (ALBUQUERQUE, 2017)

Elas constituem um grupo de microrganismos unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade e que desenvolvem a fermentação alcoólica (CARRER, 2013).

As leveduras (figura 4) apresentam membrana celular bem definida, pouco espessa em células jovens; rígidas em células adultas, de constituição variável, com predominância de hidratos de carbono e menor quantidade de proteínas e graxas. Internamente delimitando o citoplasma, existe a membrana citoplasmática, mais evidente em células adultas, por plasmolise. De maneira geral, as leveduras se apresentam sem cápsula, porém algumas espécies de *Torulopsis* se apresentem com cápsula, constituída de hidratos de carbono. (ALBURQUEQUE 2017)



Figura 6: *Saccharomyces cerevisiae* 2P2 (Albuquerque,2017)

4.1 Leveduras da Cana de Açúcar

Leveduras são microrganismos unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento desenvolvendo-se na fermentação alcoólica. Apresentam membrana celular bem definida, pouco espessa em células jovens e rígida em células adultas. Possui constituição variável, com predominância de hidratos de carbono e menor quantidade de proteínas e gorduras. Internamente delimitando o citoplasma, existe a membrana citoplasmática, mais evidente em células adultas (CARRER, 2013).

A levedura de cana (*Saccharomyces Cerevisiae*) é um produto totalmente natural, não transgênico, obtido no processo de fermentação da cana-de-açúcar, podendo ter uma significativa importância na alimentação animal. Tem como propriedade melhorar significativamente os índices zootécnicos dos animais por se tratar de uma ótima fonte de proteína. Além de elevados valores proteicos, a levedura apresenta como característica um bom balanceamento de aminoácidos, onde os níveis de lisina e metionina sobressaem em relação a outras fontes proteicas (MOREIRA et al. 2013).

4.2 Leveduras modificadas

A levedura modificada (engenheiradas) é amplamente utilizada para aumentar rendimentos em etanol no processo de produção brasileiro, sendo importante para a redução na produção de glicerol durante a fermentação (LIMA, 2019).

A aplicação da levedura modificada no processo, tende a aumentar o rendimento de etanol e reduz os subprodutos xilitol e glicerol. (PEREIRA, SANTOS e PIROLLA,2016).

As condições industriais de fermentação para produção de etanol, incluindo: batelada alimentada por mosto composto por melaço, reciclo de células por centrifugação e tratamento ácido. A esta linhagem de levedura foi isolada do processo industrial de produção de etanol a partir de sacarose da cana de açúcar. Em adição, condições de estresse foram testadas, incluindo: alta temperatura, alto brix do mosto e contaminação por levedura e bactéria (SANTOS, GUSMÃO e GOUVEIA, 2010).

5. FERMENTAÇÃO BATELADA

A fermentação batelada baseia -se na alimentação contínua de Mosto. O processo fermentativo é realizado em biorreatores (dornas) que são reatores de aço do tipo agitado, normalmente fechadas e mantidas a uma temperatura entre 33 e 35°C até o final do processo, quando a concentração de etanol se situa entre 7 e 12° GL (LIMA, 2019).



Figura 7: Processo fermentação em batelada (GERALDO, LARISSA, MIGUEL, 2012)

As dornas fechadas (figura 9) são tanques construídos geralmente em aço carbono com capacidade variável de acordo com a capacidade do processo. Com sistema de Resfriamento em virtude do calor desprendido no processo de fermentação necessita de um controle de temperatura que pode ser por trocadores a placas. Os trocadores de calor (figura 5) possuem placas que apresentam uma melhor performance no controle de temperatura, este equipamento é provido de trocadores a placas e bombas de recirculação. (SANTOS, 2016).



Figura 8: Trocador de calor a placas (SANTOS, 2016)

Este controle faz-se necessário, pois ao fermentar os açúcares do mosto há um desprendimento de energia na forma de calor, que agrega temperatura a solução de levedura com mosto, sendo que a levedura tem uma temperatura ótima de trabalho que se situa entre 28 – 33°C podendo chegar ao máximo em 35°C (SANTOS, 2016).

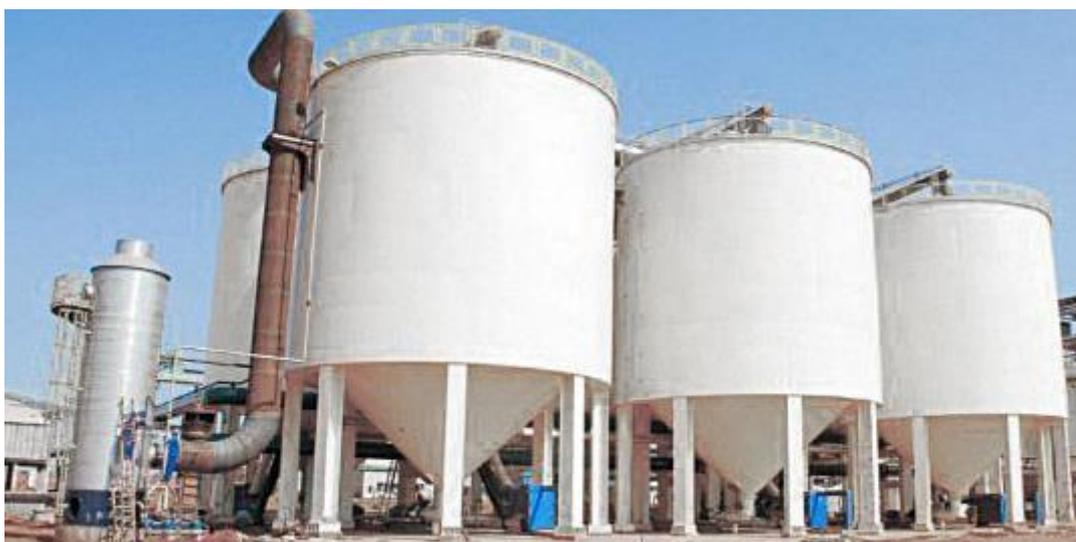


Figura 9: Dornas fechadas (ZAGO *et. al.* 1996)

6. GLICEROL ENZIMÁTICO

As leveduras durante a fermentação alcoólica produzem além de etanol e gás carbônico compostos secundários como glicerol, álcoois superiores, ácidos pirúvicos e succínico, sendo que o glicerol pode ser considerado como o mais importante componente do ponto de vista quantitativo. O glicerol formado corresponde de 8 a 15g por 100g de etanol (NASCIMENTO, 2010).

Trata-se de um poli álcool, com três hidroxilas em sua fórmula estrutural, e também pode ser chamado como glicerina, oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicol álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano. (JARDINE, BARROS e MANZONI,2008)

A formação do ácido succínico acarreta maior produção de NADH e, portanto, aumentando o glicerol formado, a biossíntese do material celular é um processo que produz NADH e assim também contribui para a formação de glicerol. A importância do glicerol na fermentação alcoólica está relacionada com a qualidade da bebida alcoólica (NORDSTROM ,1966, *apud* GUTIERREZ, 1991).

O glicerol é o mais efetivo osmorregulador presente em *S. cerevisiae* e ocorre o aumento de síntese em situações de estresse osmótico, quando também ocorre aumento da síntese de trealose (GUTIERREZ, 1991).

A trealose é um dissacarídeo constituído por duas α -D-glucose encontrada em muitos insetos, fungos e microrganismos, mas que não pode ser sintetizada por animais vertebrados. Como a sacarose, é um dissacarídeo não redutor e pode formar cristais simples, conforme figura 7 (CROWE, CROWE e CHAPMAN, 1984).

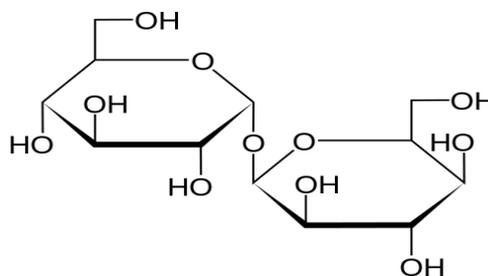


FIGURA 10: Representação de Haworth para Trealose (Wikimedia Commons¹.)

¹ Modelo disponibilizado em: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Trehalose_Haworth.svg>

7. DESTILAÇÃO

A destilação é utilizada na indústria para separar componentes químicos em produtos purificados, a separação é obtida através das diferenças na volatilidade (tendência a se vaporizar) entre os vários componentes químicos da mistura. Por exemplo, uma mistura de etanol e água pode ser separada por destilação por que o etanol é mais volátil do que a água. A destilação é processada em três colunas de destilação superpostas em aparelhos e peneira molecular. Nestas, o etanol é separado do vinho (inicialmente com 7 a 10°GL) e sai com a flegmamassa vapores com 40 a 50°GL, (MATUGI, 2013).

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Equipamentos:

- Balão de Erlenmeyer;
- Balão volumétrico 100 ml;
- Becker de vidro;
- Bastão de plástico;
- Algodão;
- Tubos de ensaio;
- Cubeta de quartzo tamanho 10 nanômetro;
- Provetas;
- Pipetas;
- Estufa bacteriológica;
- Algodão;
- Centrífuga de tubos;
- Banho Maria;
- Espectrômetro;
- Cubeta de quartzo;
- Provetas;
- Pipetas
- Cronômetro

8.2 Insumos:

- Fermento;
- Mosto;
- Água destilada;
- Reagente solução padrão enzimático;



Figura 11: Reagente solução padrão enzimático (Dados da pesquisa)

8.3 Procedimento analítico para análise de Glicerol

8.3.1 Método enzimático

A metodologia foi realizada em laboratório utilizando com uma metodologia adaptada do Manual de Métodos Analíticos Controle Químico da Fermentação (CONSULAB, 2018).

O vinho bruto foi centrifugado a 3.000 ± 50 rpm por 10 minutos, em seguida, uma porção de 10 ml de vinho centrifugado foi diluído em 200 ml com água destilada, agitou-se e transferiu-se 2 ml do extrato para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com água deionizada.

8.3.2 Determinação

Os tubos foram numerados e adicionadas as soluções. Nos tubos 1 e 2 foi adicionado 5 ml de água destilada (prova em branco), nos tubos 3 e 4 foi adicionado 5 ml de padrão (5 ppm), nos tubos 5 e 6, foi adicionado 5 ml de amostra.

Foi adicionado a cada tubo 2,0 ml de solução enzimática. Os tubos foram invertidos cuidadosamente sem agitar e colocados em banho Maria a 37 ± 2 °C, por 5 minutos.

Os tubos foram retirados do banho maria e posteriormente deixados em temperatura ambiente para o resfriamento.

A leitura foi feita em espectrofotômetro em absorvância 500 nanômetros em cubeta de 10 nanômetro.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Amostras de Fermento e Mosto:

Foram obtidas amostras de fermento e mosto (figura 9), gentilmente cedidas por uma usina de cana – de – açúcar da região para o estudo prático do trabalho.

O processo fermentativo se deu pela transformação da glicose em gás carbônico e álcool, e essa fermentação ocorreu com liberação de calor, fazendo-se necessário a utilização de um ambiente com temperatura controlada. O processo fermentativo durou de 3 dias.

Foi misturada com uma amostra de levedura industrial. O desempenho da mistura de leveduras foi comparado com uma levedura industrial por 12 ciclos fermentativos.



Figura 12: Amostra de Fermento (a), amostra de Mosto (b) (Dados da pesquisa)

Na amostra de mosto foi misturado com água para atingir o brix desejado de 23,10 °Brix a 24,60 °Brix para a fermentação. a amostra de fermento foi realizada diluição com água para 30 %.

9.2 Fermentação:

A temperatura para a fermentação foi ajustada a até 36 °C (temperatura ideal 26 °C e 32 °C) para realização do estresse térmico. O pH foi ajustado a 4,5 para inibir a ação de bactérias. A concentração do mosto foi ajustada entre 12% e 14%, para não inibir a ação da própria levedura no decorrer da fermentação (ALCARDE, s/d)



Figura 13: Amostras de fermento em estufa á 36 °C (Dados da pesquisa)

Durante a fermentação as amostras foram alimentadas com mosto de baixo brix, e houve a adição de ar por 4 horas para promover o crescimento da levedura.

Foi realizado teste de estresse térmico para acompanhar a resistência à temperatura.

Fermentação Ciclo	Temperatura C°
1	33
2	35
3	36
4	36
5	33
6	35
7	35
8	36
9	36
10	35
11	35
12	35

Tabela 1 – Dados do teste de fermentações com estresse térmico (Dados da pesquisa)

A temperatura permaneceu no ponto desejado durante a alimentação e diminuiu quando a alimentação parou.

9.3 Centrifugação:

Para o início do primeiro ciclo do experimento, foram adicionados aos tubos de centrífuga previamente tarados e identificados a biomassa de levedura. Foram adicionados em cada tubo 5 ml da amostra de fermentação e centrifugados por 10 minutos a 3.000 ± 50 rpm (ZAGO, et. al, 2003).



Figura 14: Centrifuga de tubos (Dados da pesquisa)

9.4 Análise de Glicerol:

Após a centrifugação, foi obtido 10 ml da amostra centrifugada. Em seguida a amostra foi transferida para um balão volumétrico de 200 ml e completado o volume com água destilada. Foram preparados tubos para a leitura, um tubo de prova em branco, contendo 5 ml de água destilada, um tubo com 5 ml de padrão e um tubo com 5 ml de amostra. Em todos os tubos adicionou-se 2 ml de solução enzimática. Os tubos foram invertidos cuidadosamente sem agitar e em seguida os tubos foram levados em banho Maria a 37 ± 2 °C, por 5 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro em absorvância 500 nanômetros em cubeta de 10 nanômetro (figura 12) (CONSUL-LAB,2018)

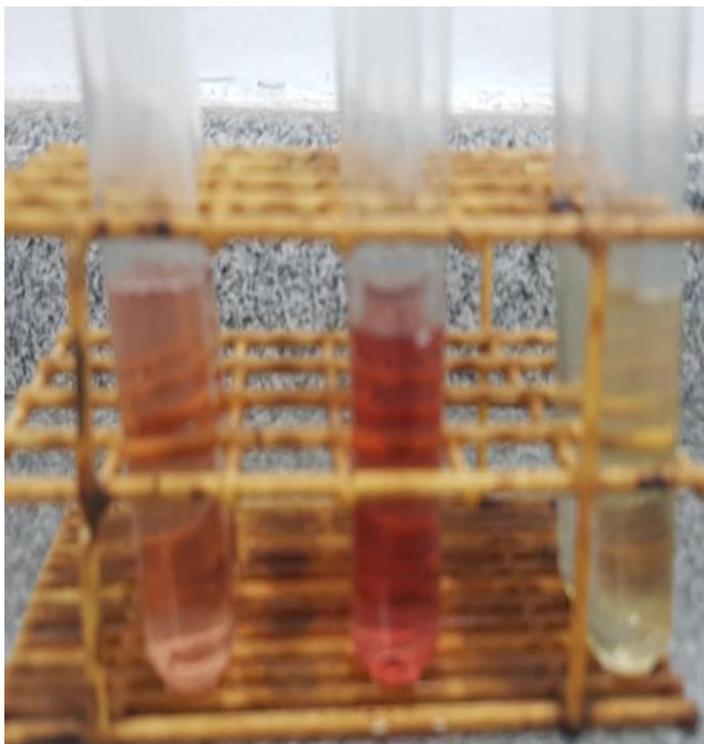


Figura 15: Tubos de ensaios com as amostras de Glicerol (Dados da pesquisa)

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Resultado dos testes em laboratório:

10.1.1 Fechamento do balanço de massa

O fechamento do balanço de massa, é um cálculo que subtrai a massa líquida pela massa recebida para perdas de massa em CO₂. O balanço de massa obtido para a fermentação em laboratório com a levedura modificada foi de 97.8% para levedura modificada e a levedura PE-2/levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi de 97.9%.

Foi realizado os testes em laboratório com vinte e quatro amostras, sendo 12 amostras com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e 12 amostras com a levedura modificada.

As amostras com levedura modificada apresentaram resultados satisfatórios em rendimento em Etanol no vinho (g/g) e baixo rendimento em glicerol (g/g), conforme tabela 02.

Ciclo	Temp. (C°)	Mosto Brix	Rendimento em Etanol no vinho (g/g)		Rendimento em Glicerol (g/g)	
			Levedura Modificada	PE-2	Levedura Modificada	PE-2
1	33	22%	7.8%	7.8%	0,018	0,021
2	35	23%	8.0%	8.1%	0,018	0,021
3	36	24%	8.1%	8.0%	0,015	0,022
4	36	24%	8.2%	8.1%	0,014	0,02
5	33	24%	8.4%	8.2%	0,013	0,019
6	35	24%	8.5%	8.4%	0,014	0,018
7	35	24%	8.8%	8.5%	0,014	0,02
8	36	24%	9.0%	8.8%	0,015	0,021
9	36	24%	9.1%	9.0%	0,015	0,02
10	35	24%	9.2%	9.0%	0,016	0,022
11	35	24%	9.4%	9.2%	0,015	0,022
12	35	24%	9.6%	9.5%	0,014	0,018
Média	35 C°	24%	8.7%	8.6%	0,015	0,020
%Dif			8.7%		0,017	

Tabela 2: Dados em rendimentos de Etanol no vinho e Glicerol

10.1.2 Glicerol durante o período de teste

A redução de glicerol foi mantida durante as condições de estresse no período do teste o alto estresse causado pelo aumento de temperatura e resultou no aumento da produção de glicerol para ambas as leveduras, entretanto, as condições de

estresse resultaram um maior aumento de rendimento para a levedura modificada na redução de glicerol em g/g.

Resultados Glicerol (g/g)		
Fermentação Ciclo	Fermento Levedura PE-2	Fermento Levedura modificada
1	0,021	0,018
2	0,021	0,018
3	0,022	0,015
4	0,020	0,014
5	0,019	0,013
6	0,018	0,014
7	0,020	0,014
8	0,021	0,015
9	0,020	0,015
10	0,022	0,016
11	0,022	0,015
12	0,018	0,014

Tabela 3: Resultados de Glicerol (Dados da pesquisa)

Os resultados analíticos de glicerol enzimático apresentados no gráfico 1, constata a eficiência e performance dos baixos resultados para a levedura modificada e altos resultados para a levedura PE-2/ *Saccharomyces cerevisiae*.

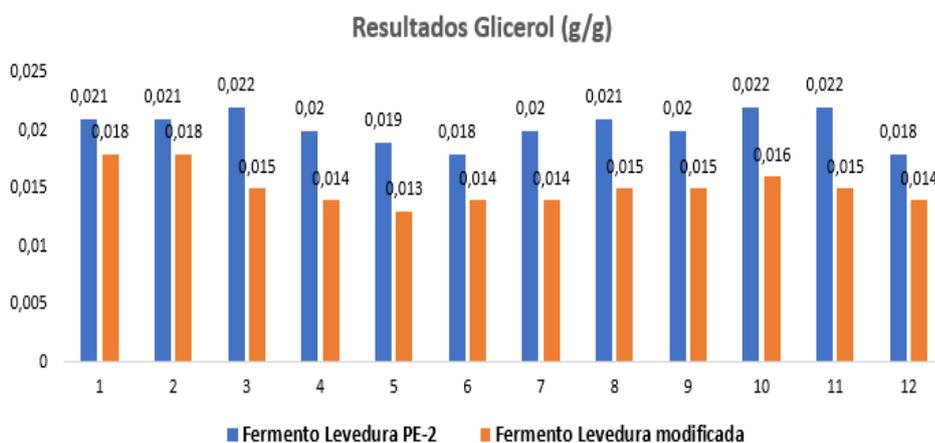


Gráfico 1: Gráfico com dados de Glicerol (Dados da pesquisa)

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Houve picos de aumento da produção de glicerol para ambas as leveduras, entretanto, as condições de estresse resultaram um maior rendimento para a levedura modificada. A levedura modificada demonstrou resistência e estresse, incluindo alto brix do substrato, alta concentração de etanol no vinho, elevada temperatura e contaminação bacteriana.

O teste apresentou sucesso em escala laboratorial. Em todos os ciclos fermentativos testados se manteve ou excedeu a cinética fermentativa da levedura convencional. A levedura modificada persistiu no processo, apresentando consistentes aumentos de rendimentos e redução de glicerol.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Caio. Levedura brasileira resulta em cerveja especial de alta qualidade. **Jornal da USP**. 19/12/2017. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/?p=136457>>. Acesso em 30/10/2021.
- ALCARDE, André Ricardo. Tratamento do caldo da cana de açúcar. Informe técnico. Agência Embrapa de Informação Tecnológica – AGEITEC. SEM DATA. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_104_22122006154841.html>. Acesso em: 30/10/2021.
- ALMEIDA, Celso Pereira de. **A influência dos contaminantes na fermentação alcoólica**. 2015. 97p. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Química. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, 2015.
- CARRER, Helaine. **Fermentação alcoólica. Material Didático de Disciplina** Departamento de Ciências Biológicas LCB Bioquímica / ESALQ da Universidade de São Paulo. USP, 2013. Disponível em: <<https://silو.tips/download/fermentacao-alcoolica>>. Disponível em: ,> Acesso em 30/10/2021.
- CONSUL-LAB. **Manual de Métodos Analíticos Controle Químico da Fermentação**. Versão 01. CONSUL-LAB-MCF-001, 2018.
- CROWE, J.; CROWE, L.; CHAPMAN, D. Preservação de membranas em organismos anidrobióticos: o papel da trealose. **Science** , v. 223, n. 4637, p. 701-703. 1984.
- GUTIERREZ, L.E. **Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de Saccharomyces cerevisiae e Sacchharomyces uvarum**. Piracicaba, 1989. 160p. TESE (LivreDocência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GUTIERREZ, Luiz Eduardo. Produção de glicerol por linhagens de Saccharomyces durante fermentação alcoólica. **An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz v. 48**. Universidade de São Paulo - USP Departamento de Química - 1991. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/aesalq/a/QJXhBSq777Y3DSz7PRT7VLr/?lang=pt>>. Acesso em 30/10/2021.
- JEOV. **Mudança química no animal – Fermentação**. Tese, 428 Palavras, p.1,2014 Disponível em: < <https://www.trabalhosgratuitos.com/Biol%C3%B3gicas/Medicina/Mudan%C3%A7a-qu%C3%ADmica-no-animal-493730.html>>. Acesso em 25/10/2021.
- LIMA, Cleiton Santos. **Produção de etanol celulósico por Spathaspora passalidarum a partir do bagaço de cana-de-açúcar: estratégia para melhorar fermentabilidade e estudo do perfil metabólico durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico**. 2019. 184f. TESE (Doutorado). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. USP, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-29012020-154552/publico/BIT19006_C.pdf>. Acesso em 30/10/2021.
- MATUGI, Karina. **Produção de etanol anidro por destilação extrativa utilizando soluções salinas e glicerol**. 2013, 172p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/4111/4994.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso e 30/10/2021.

MELO, Hélio Fernandes de, **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. 2006, 118f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/650/1/arquivo4595_1.pdf>. Acesso em: 30/10/2021.

MENDES, Sidney Gonçalves **O processo de fermentação endógena**. 2014. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2014. Disponível em: <<https://cepein.femanet.com.br/BDigital/argTccs/0811290359.pdf>>. Acesso em 30/10/2021.

MOREIRA, Bruna Luiza Dacanal; PARAZZI, Clovis; PAPIN, Larissa Ferreira; LOPES, Jorge José Corrêa. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica . **Bioscience Journal** , v. 29, 12 Nov. 2013. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/18047>>. Acesso em: 30/10/2021.

PEITER, Gabrielle Caroline; ALVES, Helton José; SEQUINEL, Rodrigo. BAUTITZ, Ivonete Rossi. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.5, n.4, p.519-537, 2016. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/rber/article/view/46501>> Acesso em: 30/10/2021.

PEREIRA, Gonçalo Amarante Guimarães; SANTOS Leandro Vieira dos; PIROLLA, Renan Augusto Siqueira. Levedura Industrial Geneticamente Modificada LUY127 com a via oxo - redutiva de conversão de Xilose, cassetes de expressão gênica, processo de obtenção de Etanol E2G e uso da levedura LUY127. **Perfil da tecnologia Inova Unicamp, 956_CEREVISAE**. Disponível em: <https://www.inova.unicamp.br/portfolio/levedura-industrial-geneticamente-modificada-luy127/> > Acesso em: 15/10/2021.

RIVALDI, Juan Daniel; SARROUH, Boutros Fouad; FIORILO, Rodolfo; SILVA, Silvio Silvério da, **Glicerol de biodiesel**. In: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento (Online), v. 37, p. 44-51, 2008. Disponível em : [Recurso Eletrônico: Glicerol de biodiesel \(embrapa.br\)](http://www.embrapa.br/recursos/eletronico/glicerol-de-biodiesel) >. Acesso em 22/10/2021.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves dos; GUSMÃO, Norma Buarque de; GOUVEIA, Ester Ribeiro. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.75-80, 2010

SANTOS, Márgda Correia dos. **Condução de fermentação etanólica contínua com o uso de antibiótico**. 2016, 62f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Rio Largo, 2016. Disponível em: < <https://ceca.ufal.br/pt-br/pos-graduacao/energia-da-biomassa/documentos/dissertacoes-ppgeb/dissertacoes-arquivos/MAGDA%20CORREIA%20DOS%20SANTOS.pdf>>. Acesso em 30/10/2021.

TELEKEN, Joel Gustavo. Bioetanol. **Material Didático da Disciplina de Mestrado da Universidade Federal do Paraná** – setor Palotina-PR, 2017. Disponível em: < http://www.palotina.ufpr.br/portal/bioenergia/wp-content/uploads/sites/5/2017/05/Joel_Teleken_Bioetanol_BIOENERGIA_BIOETANOL_2017.pdf>. Acesso em 30/10/2021.

VIEIRA, Érica Nascif Rufino. **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de amins bioativas e carbamato de etila em destilados falcoólicos**. 2011, 167f . TESE (Doutorado em ciência e tecnologia de alimentos) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2011. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/442/1/texto%20completo.pdf>>.

Acesso em: 30/10/2021.

VOLPE, Pedro, L.O. Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. **QUÍMICA NOVA**, v.20, n.5, 1997. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/xjrzpMcvjSWZCfvqvLy84fh/?lang=pt&format=pdf>>.

Acesso em 30/10/2021.

ZAGO, E A; SILVA, L F L F; BERNARDINO, C D; AMORIM, H V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar. Piracicaba: Fermentec/Fealq/Esalq. 1996.

RIVALDI, Juan Daniel;
FIORIOLO, Rodolfo; SILVA, Silvio Silvério da,

SARROUH,

Boutros

Fouad;