Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico

Fernando César Tonoli

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2017

Fernando César Tonoli
Engenheiro Agrônomo

Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Microbiologia agrícola

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Tonoli, Fernando César

Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico / Fernando César Tonoli. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -Piracicaba, 2017.

77 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Área de Concentração: Microbiologia Agrícola) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Etanol 2. Saccharomyces 3. Fermentação alcoólica 4. Microscopia eletrônica de varredura 5. Adaptação.

Dedicatória

Aos meus pais Cyrineo e Ana Lúcia

À minha esposa Raphaella

Ao meu filho Danilo

Agradecimentos

A Deus, por permitir a realização desse sonho.

Ao Professor Dr. Antonio Sampaio Baptista, pelos ensinamentos, orientação, amizade e estímulo, desde a graduação, até a execução deste trabalho.

Aos meus pais Cyrineo e Ana Lúcia, pelo apoio, incentivo e investimento em meus estudos.

À minha esposa Raphaella, pelo amor, dedicação e a apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu filho Danilo, por existir em minha vida e me dar forças para ser uma pessoa e um profissional melhor.

Aos meus irmãos César e Andressa pela amizade.

À toda minha família, por acreditarem em mim e incentivarem meus estudos.

Às colegas de laboratório Leibou, Manu e Gabi pela grande ajuda na realização das cinéticas de fermentação e nas análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Francisco Tanaka e ao técnico Renato, pelo auxílio nas análises realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura.

À Professora Dr. Sônia Maria de Stefano Piedade pela grande ajuda na análise estatística dos dados.

A todos os integrantes do grupo "Hugot Bioenergia", pela ajuda e companheirismo.

A todos os funcionários do Laboratório de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pelo constante apoio na realização de minhas atividades.

Aos técnicos do LAN, Rose, Sylvino e Pedrinho, pela boa vontade em me ajudar sempre que precisei.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária da ESALQ, por disponibilizar o uso do microscópio eletrônico de varredura.

Ao programa de Pós–Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta realização.

Epígrafe

“O único lugar onde o sucesso vem
antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

Sumário

RESUMO **8**

ABSTRACT **9**

LISTA DE FIGURAS **10**

LISTA DE TABELAS **11**

1. INTRODUÇÃO **13**

2. OBJETIVOS **15**

3. REVISÃO DE LITERATURA **17**

3.1. PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL E NO MUNDO 17
3.2. PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR 19
PARÂMETRO 20
3.3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 21
3.4. FERMENTAÇÃO COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 22
3.4.1. Fatores inibidores do processo de fermentação com alto teor alcoólico *24*
3.4.1.1. Toxicidade do etanol 24
3.4.1.2. Sub-produtos do processo fermentativo 25
3.4.1.3. Temperatura 25
3.4.1.4. Pressão osmótica resultantes de altas concentrações de açúcar no substrato 26
3.4.1.5. Contaminação por bactérias e leveduras selvagens 27
3.4.2. Avanços em fermentação com alto teor alcoólico *28*
3.5. ADAPTAÇÃO DAS LEVEDURAS ÀS CONDIÇÕES DE ESTRESSE 28
3.6. CROMATOGRAFIA DE ÍONS 30
3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 31

4. MATERIAL E MÉTODOS **33**

4.1. PRIMEIRA ETAPA: DEFINIÇÃO DO SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO DO MOSTO PARA AS FERMENTAÇÕES COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 33
4.2. SEGUNDA ETAPA: ADAPTAÇÃO DAS LEVEDURAS PARA A FERMENTAÇÃO COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 34
4.3. TERCEIRA ETAPA: FERMENTAÇÃO COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 35
4.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 36
4.4.1. Viabilidade celular *36*
4.4.2. Concentração celular *36*
4.4.3. Biomassa de leveduras *37*
4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) *37*
4.4.4.1. Preparo das amostras para a visualização no MEV 38
4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 38
4.5.1. Determinação de sacarose, frutose, glicose, glicerol e manitol no mosto e no vinho. *38*
4.5.2. Determinação de etanol nos vinhos delevedurados *38*
4.5.3. Rendimento fermentativo *39*
4.5.4. Produtividade de etanol *39*
4.5.5. Refratometria na escala Brix *39*
4.5.6. Concentração de ácidos orgânicos no vinho delevedurado *39*
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 39
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **41**

5.1. DEFINIÇÃO DO SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO DO MOSTO PARA REALIZAR EM BANCADA AS FERMENTAÇÕES COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 41
5.2. ADAPTAÇÃO DAS LEVEDURAS PARA A FERMENTAÇÃO COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 42
5.2.1. Viabilidade *42*
5.2.2. Biomassa e concentração celular *43*
5.2.3. Açúcares Residuais no vinho *44*

5.2.4. Concentração de etanol no vinho *46*
5.2.5. Rendimento fermentativo *47*
5.2.6. Tempo de fermentação e produtividade em etanol *48*
5.2.7. Glicerol *49*
5.2.8. Ácido lático e manitol *51*
5.2.9. Ácidos acético, succínico, fórmico *52*
5.2.10. Ácido aconítico *54*
5.2.11. Microscopia eletrônica de varredura *55*
5.3. FERMENTAÇÃO COM ALTO TEOR ALCOÓLICO 58
5.3.1. Viabilidade celular *58*
5.3.2. Glicerol *59*
5.3.3. Açúcares Residuais no vinho *59*
5.3.4. Concentração de etanol no vinho *60*
5.3.5. Rendimento fermentativo *61*
5.3.6. Tempo de fermentação e produtividade em etanol *62*
5.3.7. Manitol *62*
5.3.8. Ácidos orgânicos *63*
5.3.8.1. Ácido lático 63
5.3.8.2. Ácido acético 64
5.3.8.3. Ácido succínico 65
5.3.8.4. Ácidos fórmico e aconítico 65
5.3.9. Microscopia eletrônica de varredura *66*
6. CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS 71

RESUMO

Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico

No processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, a destilação do mosto fermentado resulta na geração de grande volume de vinhaça. Em média, para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 12 litros de vinhaça. Devido ao volume de vinhaça produzido e ao limite de aplicação de vinhaça por área, estabelecido pela CETESB, os gastos com o gerenciamento deste resíduo tornaram-se muito altos (R$ 17,33 por m^3, considerando a distribuição por caminhão para uma distância de 20 a 25 Km). Isso levou o setor sucroenergético a buscar alternativas visando diminuir do volume de vinhaça produzida. Dentre essas alternativa, destaca-se o processo de fermentação com alto teor alcoólico. Este processo pode diminuir em até 50% o volume de vinhaça gerado, além de apresentar inúmeras vantagens técnicas, econômicas e ambientais. Por esses motivos, o objetivo deste trabalho foi realizar a adaptação das linhagens de leveduras C22 e Y904 para fermentações com altos teores alcoólicos e verificar as alterações morfológicas das linhagens C22 e Y904 ao longo do processo de adaptação e após a fermentação com alto teor alcoólico, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, foram realizadas fermentações com concentrações crescentes de açúcares nos mostos (50 à 274,52 g L^{-1}). No ciclo de fermentação com alto teor alcoólico, a viabilidade das leveduras C22 e Y904 adaptadas foi 70,1% (83,5% e 56,7%, respectivamente); já a viabilidade média das leveduras C22 e Y904 não adaptadas foi 62% (68,8% e 55,2%, respectivamente). As imagens do MEV mostraram que a linhagem C22 adaptada apresentou aspecto morfológico de melhor resposta ao estresse exposto do que as demais leveduras. Conclui-se que a escolha da linhagem e sua adaptação prévia são fundamentais para a condução de fermentações com alto teor alcoólico.

Palavras-chave: Etanol. Saccharomyces. Fermentação alcoólica. Microscopia eletrônica de varredura. Adaptação de leveduras.

ABSTRACT

Yeast adaptation for very high gravity fermentation

In ethanol production process, the distillation of sugarcane fermented must result in large volume of vinasse. For each liter of ethanol produced around 12 liters of vinasse are generated. Due to the vinasse application limit per area, established by CETESB, the costs to manage this waste became very high (R$ 17,33 per m^3, considering the distribution by truck for a distance of 20 to 25 km). This led the sugarcane industry to seek alternatives to reduce the volume of vinasse produced. The process of fermentation with high alcohol content is one of the options; it can reduce by 50% the volume of vinasse generated and presents numerous technical, economic and environmental advantages. For these reasons, the aim of this study was to adapt the yeasts strains C22 and Y904 for fermentations with high alcohol levels and verify the morphological changes of C22 and Y904 strains in the process of adaptation and fermentation with high alcohol content, by scanning electron microscopy (SEM). For this purpose, fermentations with increasing concentrations of sugar in the must (50 to 274.52 g L^{-1}) were performing. In the fermentation cycle with high alcohol content, the viability of C22 and Y904 yeast adapted was 70.1% (83.5% and 56.7%, respectively); the viability of the yeast C22 and Y904 unadapted was 62% (68.8% and 55.2%, respectively). The SEM images showed that the C22 adapted strain presented better morphological response to stress exposure than other yeast strains. We conclude that the choice of yeast strain and his previous adaptation are essential for conducting fermentations with high alcohol content.

Keywords: Ethanol. Saccharomyces. Alcoholic fermentation. Scanning electron microscopy. yeast adaptation.

Lista de Figuras

Figura 1. Consumo, produção e exportação de etanol pelo Brasil. 17

Figura 2. Matérias-primas produzidas por país por ano. 18

Figura 3. Produtividade de etanol (L ha^{-1}) a partir de diferentes matérias-primas. 18

Figura 4. Fluxograma de produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar. 19

Figura 5. Cinética de desenvolvimento das leveduras. 21

Figura 6. Fermentação por batelada alimentada (Melle-Boinot). 22

Figura 7. Ilustração dos principais métodos que podem ser utilizados para adaptação das leveduras em fermentações sob condições de estresse 29

Figura 8. Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura 31

Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura da levedura *Saccharomyces Cerevisiae* submetida aos tratamentos com eugenol e timol por 90 minutos. 32

Figura 10. Cinética das fermentações realizadas no experimento. 35

Figura 11. Esquema demonstrando como era preparada a amostra de mosto para a análise de viabilidade celular das leveduras. 36

Figura 12. Ilustração dos quadrantes de uma Câmara de Neubauer 37

Figura 13. Concentrações de etanol nos vinhos ao longo dos ciclos fermentativos de adaptação das linhagens Y904 e C22. 46

Figura 14. Concentração de glicerol do vinho e do mosto ao longo dos ciclos fermentativos. 50

Figura 15. Concentração de manitol do vinho e do mosto ao longo dos ciclos fermentativos. 52

Figura 16. Concentração de ácido aconítico presente no vinho delevedurado, ao longo dos ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22. 54

Figura 17. Imagens das leveduras ao longo do processo de adaptação, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). 56

Figura 18. Imagens da levedura Pedra 2 ao longo do processo de adaptação por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com aumento de 5000x. A: 9°Brix, B:24°Brix. 57

Figura 19. Imagens das leveduras ao término da fermentação com alto teor alcoólico. 66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características físico-químicas da vinhaça resultante de vinhos provenientes de melaço, de caldo de cana e de mostos mistos. **20**

Tabela 2. Concentrações de sólidos solúveis dos mostos utilizados em cada ciclo fermentativo **33**

Tabela 3. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e concentração de açúcares dos mostos ao longo dos ciclos fermentativos. **34**

Tabela 4. Descrição dos tratamentos conduzidos com as fermentações com alto teor alcoólico. **35**

Tabela 5. Teor alcoólico, viabilidade, produtividade e concentração de açúcares em amostras de vinhos ao término dos ciclos fermentativos. **42**

Tabela 6. Viabilidade celular (%) das leveduras ao término dos ciclos fermentativos de adaptação das linhagens Y904 e C22. ..... **43**

Tabela 7. Biomassa de leveduras ao término dos ciclos fermentativos de adaptação das linhagens Y904 e C22. ..... **44**

Tabela 8. Concentrações de glicose e frutose residuais no vinho, durante os ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22. ..... **45**

Tabela 9. Rendimentos fermentativos médios ao longo dos ciclos fermentativos para a adaptação das linhagens Y904 e C22. ..... **47**

Tabela 10. Produtividade de etanol por ciclo e levedura e tempo de fermentação. **48**

Tabela 11. Concentração de ácido lático presente no vinho delevedurado, ao longo dos ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22. ..... **51**

Tabela 12. Concentrações dos ácidos acético, succínico e aconítico presentes no vinho delevedurado, ao longo dos ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22. ..... **53**

Tabela 13. Viabilidade celular (%) das leveduras ao término da fermentação. **58**

Tabela 14. Concentrações de glicose e frutose residuais, gramas por litro, no vinho delevedurado. **60**

Tabela 15. Teor alcoólico no vinho delevedurado (% v v^{-1}). **61**

Tabela 16. Concentrações de glicose e frutose residuais no vinho delevedurado. **63**

Tabela 17. Concentrações de ácidos orgânicos no vinho delevedurado. **64**

1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados da União da Indústria de cana-de-açúcar (UNICA, 2016), a produção nacional de etanol na safra 2015/16 foi de aproximadamente 30,4 bilhões de litros. Esse valor corresponde a mais de 30% da produção mundial (RFA, 2016) e é aproximadamente o dobro volume produzido a dez anos atrás no país (OECD/FAO, 2015). No Brasil, mais de 99% do volume total de etanol é produzido utilizando a cana-de-açúcar como matéria prima.

Na produção de etanol via fermentativa, a destilação do mosto fermentado obtido a partir de cana-de-açúcar resulta na geração em grande quantidade de um resíduo chamado vinhaça. Em média, para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 12 litros de vinhaça (UNICA, 2012). De modo que, no Brasil, pode-se estimar que na safra 2015/16, foram produzidos aproximadamente 365 bilhões de litros de vinhaça. Esse valor é maior do que três vezes à produção mundial de etanol no mesmo período (RFA, 2016).

Devido às suas características físico-químicas, a vinhaça é utilizada como fertilizante nas áreas agrícolas das usinas. No entanto, a mesma apresenta alto poder poluidor, cerca de 100 vezes maior que o esgoto doméstico, (FREIRE & CORTEZ, 2000). Ao ser aplicada no solo, a vinhaça pode acarretar modificações na dinâmica de íons, promovendo lixiviação de ânions como o nitrato, podendo poluir águas subterrâneas e aquíferos. Isto pode ocasionar um grande problema, uma vez que grande parte da produção de açúcar e etanol no estado de São Paulo se localiza sobre a chamada região de recarga do aquífero Guarani, um dos mais importantes reservatórios de água doce da América do Sul.

Por esses motivos, em 2006, por meio da norma técnica P 4.231, a CETESB estabeleceu limites para a aplicação da vinhaça nos solos agrícolas (CETESB, 2006). Desse modo, os gastos com o gerenciamento deste resíduo tornaram-se muito altos, em torno R$ 17,33 m^3 para o transporte via por caminhão a uma distância de 20 a 25 Km[1].

Visando melhorar a eficiência para a aplicação da vinhaça, aliada à diminuição dos custos e principalmente a redução do impacto ambiental, o setor sucroenergético vem investindo em tecnologias, como a fermentação com alto teor alcoólico.

Atualmente, as fermentações alcoólicas são realizadas utilizando mostos diluídos, com cerca de 16 °Brix. Caso o mosto possa ser concentrado até 32°Brix, o volume de vinhaça pode diminuir pela metade (FAPESP, 2010).

O processo de fermentação com alto teor alcoólico visa não somente diminuir o volume da vinhaça, mas também aumentar a produção do etanol e apresenta inúmeras vantagens técnicas, econômicas e ambientais. O uso desta tecnologia permite: menor investimento de capital, custo de mão de obra, consumo de energia por litro de etanol produzido, diminuição do consumo de água, facilidades de limpeza e sanitização, melhor assepsia, entre outros (THOMAS et al., 1996).

[1] Comunicação pessoal, Engenheiro Agrônomo Rafael Douradinho, 2016.

2. OBJETIVOS

Adaptação das leveduras

- Adaptar as linhagens C22 e Y904 para fermentações com altos teores alcoólicos;
- Verificar a morfologia das leveduras ao longo do processo de adaptação, aplicando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Fermentação com alto teor alcoólico

- Verificar se há diferenças no comportamento das linhagens C22 e Y904, quando adaptadas para realizar fermentações com altos teores alcoólicos;
- Verificar o efeito da fermentação com alto teor alcoólico sobre a morfologia das leveduras adaptadas e não adaptadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de etanol no Brasil e no mundo

De acordo com dados da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2016), a produção nacional de etanol na safra 2015/16 foi de 30,4 bilhões de litros. Esse valor corresponde a mais de 30% da produção mundial de etanol (RFA, 2016).

Nos últimos oito anos, a produção nacional de etanol duplicou, e segundo previsões da OECD/FAO (2015), até 2024 a produção nacional aumentará em mais de 40 % (Figura 1).

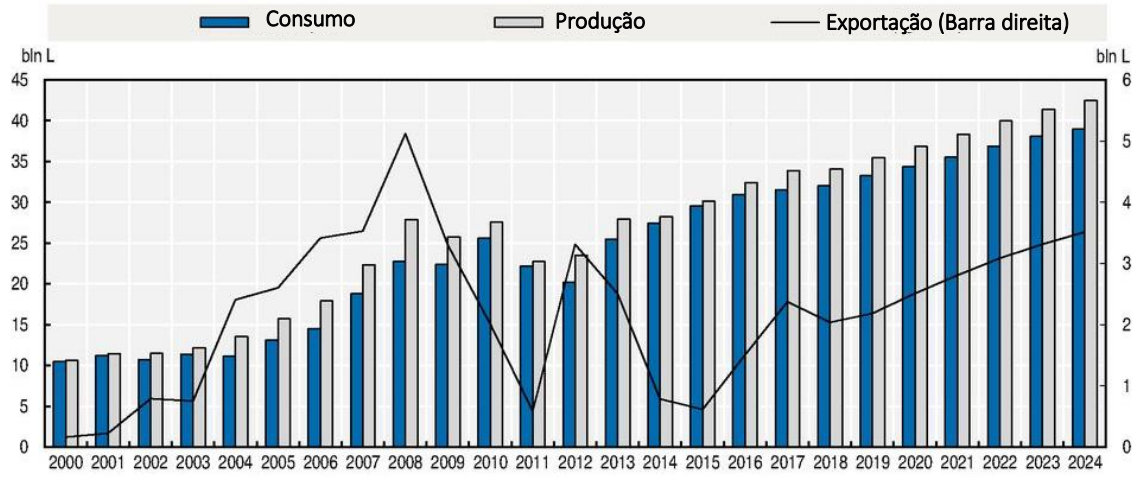

Figura 1. Consumo, produção e exportação de etanol pelo Brasil.

Fonte: OECD/FAO, 2015.

O etanol pode ser produzido a partir de qualquer matéria-prima que apresente açúcares fermentescíveis, como: as frutas, os cereais, as raízes, os tubérculos, os colmos, entre outros (INGLEDEW, 2009).

A escolha da matéria-prima a ser utilizada para a produção de etanol é influenciada por questões culturais, agrícolas, geográficas e políticas. Geralmente, a matéria-prima escolhida é aquela que está prontamente disponível na região (Figura 2) (INGLEDEW, 2009).

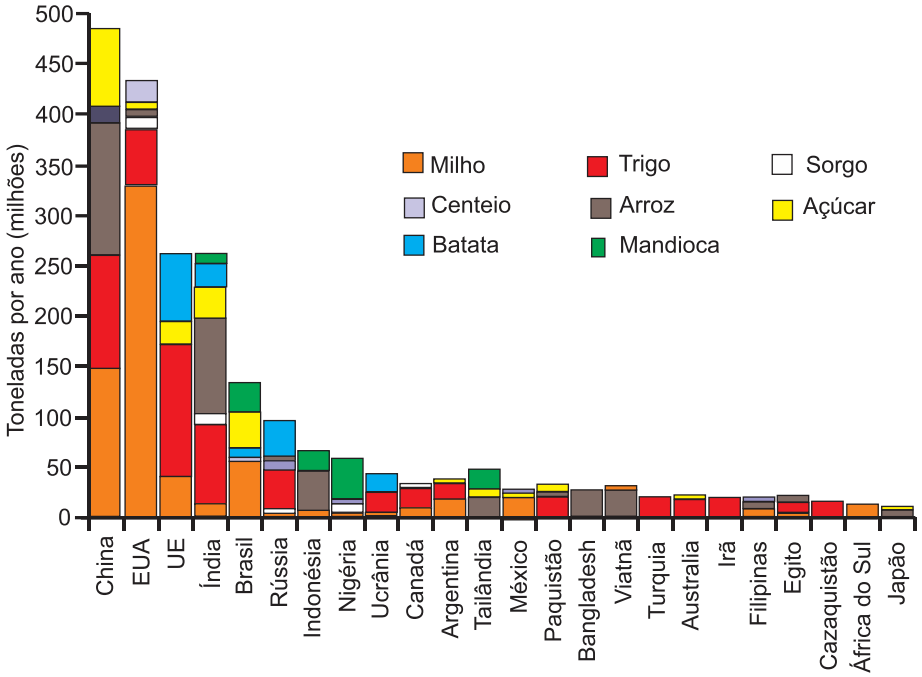

Figura 2. Matérias-primas produzidas por país por ano.

Fonte: INGLEDEW, 2009 (Adaptado).

Apesar de ser possível produzir etanol a partir de qualquer fonte de açúcares, a produtividade de etanol, obtida por unidade área da cultivada, varia de uma cultura para outra, como pode ser observado na Figura 3 (BNDES/CGEE, 2008).

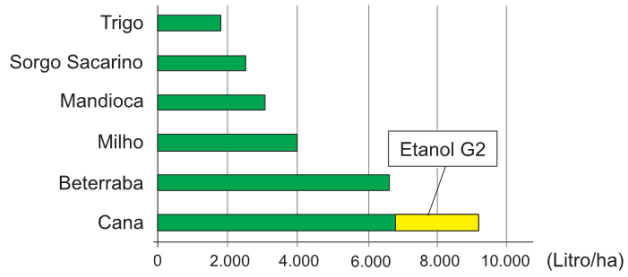

Figura 3. Produtividade de etanol (L ha^{-1}) a partir de diferentes matérias-primas.

Fonte: BNDES/CGEE, 2008 (Adaptado).

No Brasil, mais de 99% do volume total de etanol é produzido a partir da cana-de-açúcar, a qual apresenta maior produtividade por unidade área do que as demais matérias-primas utilizadas no país. Além disso, menor custo de produção e alto teor de fibras. O que dispensa o uso de outros materiais para a produção do vapor e energia no processo industrial (BNDES/CGEE, 2008).

3.2. Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar

A Figura 4 ilustra o fluxograma da produção de açúcar e de etanol a partir de cana-de-açúcar.

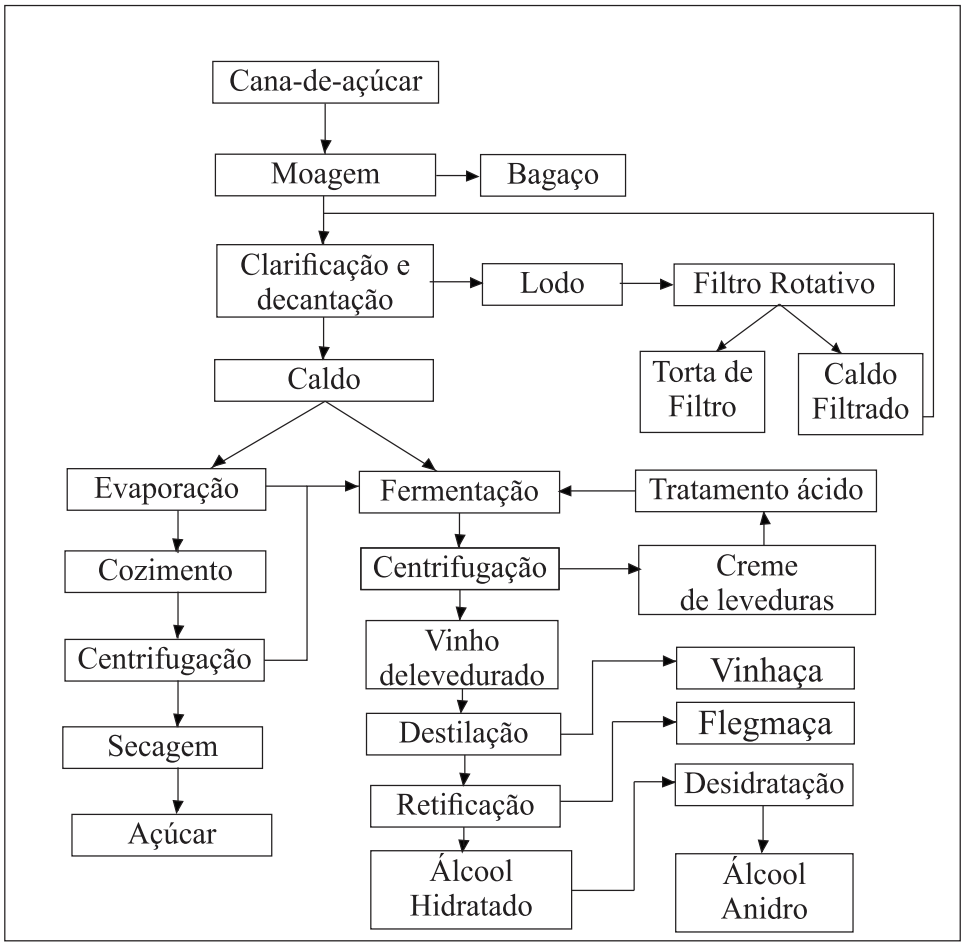

Figura 4. Fluxograma de produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar.
Fonte: BNDES/CGEE, 2008 (adaptado).

A vinhaça e o bagaço da cana-de-açúcar são os principais resíduos gerados no processo de produção de etanol. Em média, para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 12 litros de vinhaça (UNICA, 2012). Considerando esta proporção, pode-se estimar que na safra 2015/16, foram produzidos aproximadamente 365 bilhões de litros de vinhaça, apenas no Brasil.

Comparada com o bagaço, a torta de filtro e outros resíduos orgânicos produzidos pela indústria sucroenergética, a vinhaça é a mais rica em nutrientes, principalmente em potássio, o qual representa 20% do total dos nutrientes presentes nesse material (MARQUES, 2006). Além do potássio, a vinhaça também é fonte de cálcio, magnésio, fósforo, manganês e nitrogênio orgânico (CERRI et al., 1988). Devido à sua concentração de nutrientes, a vinhaça é principalmente utilizada para a fertirrigação dos canaviais.

Apesar de ser uma boa fonte de nutrientes, a vinhaça apresenta alto potencial de poluição, cerca de 100 vezes maior que o esgoto doméstico. Logo, pode ser altamente nociva à fauna, flora e microflora (FREIRE &

CORTEZ, 2000). O poder poluidor da vinhaça varia de acordo com o preparo do mosto, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas da vinhaça resultante de vinhos provenientes de melaço, de caldo de cana e de mostos mistos.

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura	80 – 100	80 – 100	80 – 100
DBO (mg L^{-1} O_2)	25000	6000 – 16500	19800
DQO (mg L^{-1} O_2)	65000	15000 – 33000	45000
Sólidos totais (mg L^{-1})	81500	23700	52700
Sólidos voláteis (mg L^{-1})	60000	20000	40000
Sólidos fixos (mg L^{-1})	21500	3700	12700
Nitrogênio (mg L^{-1} N)	450 – 1600	150 – 700	480 – 710
Fósforo (mg L^{-1} P_2O_5)	100 – 290	10 – 210	9 – 200
Potássio (mg L^{-1} K_2O)	3740 – 7830	1200 – 2100	3340 – 4600
Cálcio (mg L^{-1}CaO)	450 – 5180	130 – 1540	1330 – 4570
Magnésio (mg L^{-1} MgO)	420 – 1520	200 – 490	580 – 700
Sulfato (mg L^{-1} SO_4)	6400	600 – 760	3700 – 3730
Carbono (mg L^{-1} C)	11200 – 22900	5700 – 13400	8700 – 12100
Relação C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Matéria orgânica (mg L^{-1})	63400	19500	38000

Fonte: SOPRAL, 1986.

Em 2006, por meio da norma Instrução Normativa P 4.231, a CETESB estabeleceu que a concentração máxima de potássio no solo, não pode exceder 5% de sua CTC e caso isso ocorra, a aplicação da vinhaça ficará restrita à reposição desse nutriente em função da extração média pela cultura, que é de cerca de 185 Kg de K_2O ha^{-1} $corte^{-1}$ (CETESB, 2006)

De acordo com o Engenheiro Agrônomo Rafael Douradinho, o valor do frete pago pelo transporte da vinhaça a uma distância de 20 a 25 Km é em torno de R$17,33 por metro cúbico[2]. Com base neste valor e na capacidade média por caminhão (em torno de 18 mil litros), caso toda a vinhaça produzida no país fosse transportada a essa distância, o custo total seria em torno de 5,8 bilhões de reais.

Visando uma maior eficiência na aplicação da vinhaça, aliada a diminuição dos custos e do impacto ambiental, o setor sucroenergético vem investindo em tecnologias para a redução do volume desse resíduo gerado como a fermentação com alto teor alcoólico (FERMENTEC, 2016).

[2] Comunicação pessoal, Engenheiro Agrônomo Rafael Douradinho, 2016.

3.3. Fermentação alcoólica

A fermentação consiste no metabolismo e bioconversão dos carboidratos em etanol e dióxido de carbono por micro-organismos, sob condições anaeróbias (INGLEDEW, 2009). No caso da fermentação alcoólica industrial, o micro-organismo utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A sacarose, bem como a glicose e a frutose presentes no caldo de cana são prontamente disponíveis para a fermentação, isso porque as leveduras produzem a enzima invertase, a qual é responsável pela hidrólise da sacarose em frutose e glicose.

Segundo GUTIERREZ (1988), a utilização do melaço em maior concentração para a produção de etanol pode afetar a fermentação, devido a presença de alguns componentes produzidos em consequência da degradação térmica dos açúcares redutores durante o processamento do caldo de cana-de-açúcar. Dentre estes compostos podem-se citar os ácidos fórmico, propiônico. Além destes ácidos outro ácido de grande importância para a produção de açúcar, na formação de cor, e que pode afetar a fermentação é o ácido aconítico, o principal ácido da cana-de-açúcar. Segundo GUTIERREZ (1989), a concentração média de ácido aconítico no caldo de cana-de-açúcar está em torno de 948,2 mg L^{-1} e tende a diminuir com o aumento do grau de maturidade.

O processo de fermentação pode ser conduzido de três formas nas usinas, sendo elas: batelada, batelada alimentada e fermentação contínua. A fermentação por batelada é utilizada em pequenas destilarias. A batelada alimentada, por sua vez, é o processo mais utilizado na produção de etanol, isso por ser uma operação fácil, que não exige muito conhecimento técnico, monitoramento do processo e garante maior flexibilidade nas operações. Além disso, o produto final apresenta maior concentração alcoólica e rendimento fermentativo (INGLEDEW, 2009).

Na batelada alimentada, o mosto não é adicionado de uma única vez, mas sim aos poucos, para minimizar a pressão osmótica a qual as leveduras são submetidas. Com isso, o crescimento das leveduras tende a se manter na fase exponencial (Figura 5), garantindo assim altos valores de produtividade e de rendimento fermentativo (INGLEDEW, 2009).

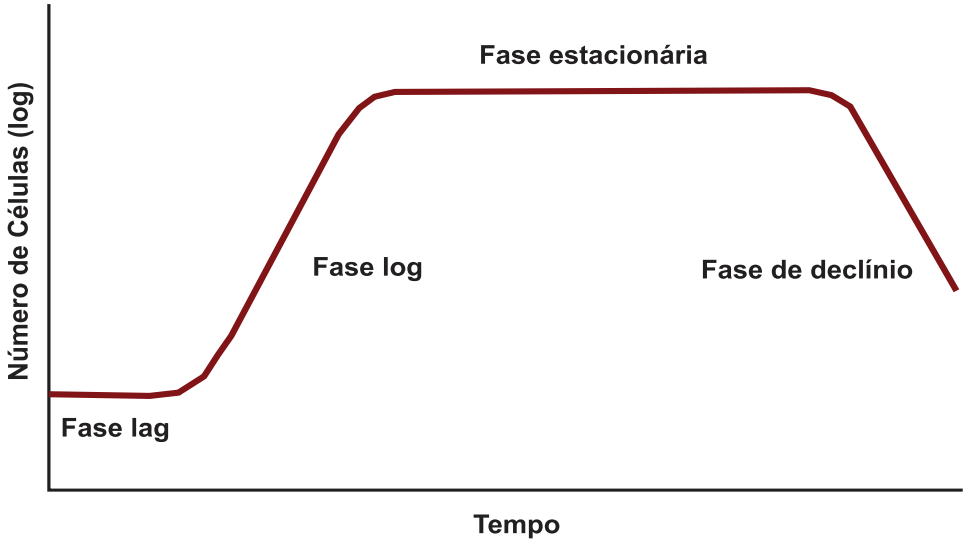

Figura 5. Cinética de desenvolvimento das leveduras.

Fonte: PRESCOTT et al., 2008 (Adaptado).

No Brasil, o processo de batelada alimentada mais utilizado é o Melle-Boinot, o qual baseia-se na recuperação do fermento de uma dorna depois de concluída a fermentação e consequente reutilização do mesmo em um novo ciclo de fermentação, como observado na Figura 6 (BNDES/CGEE, 2008).

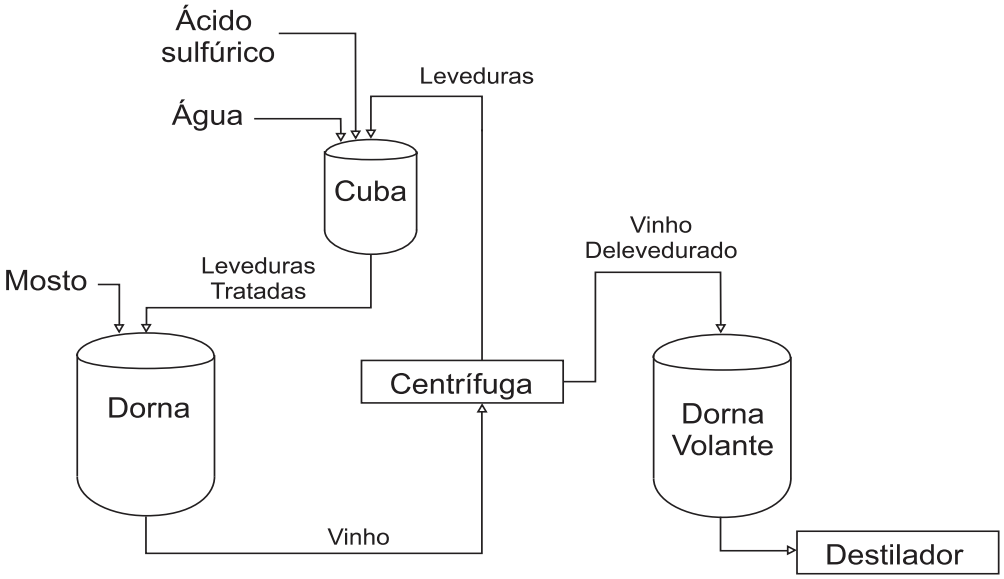

Figura 6. Fermentação por batelada alimentada (Melle-Boinot).
Fonte: BASSO et al., 2011 (Adaptado).

Em sua forma mais simples, a fermentação contínua faz-se alimentando uma dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração de açúcares adequada ao consumo das leveduras. No mesmo fluxo e com a mesma vazão que a dorna é alimentada, o mosto fermentado é retirado da última dorna, centrifugado e encaminhado para a destilação (LIMA, 1992). As vantagens desse processo são: uso mais eficiente dos equipamentos e produtos mais homogêneos (INGLEDEW, 2009).

De um modo geral, em ambos os casos os processos de fermentação alcoólicas realizados nas usinas são geralmente conduzidos utilizando mostos com aproximadamente 16% de sólidos solúveis. Contudo, há estudos que indicam a possibilidade de se realizar a fermentação com alto teor alcoólico ou Very High Gravity Fermentation (VHG), com concentrações de açúcares no mosto maiores do que 250 g L^{-1} (LAOPAIBOON et al., 2009).

3.4. Fermentação com alto teor alcoólico

Em princípio, os estudos de fermentação com alto teor alcoólico foram conduzidos com mostos utilizados para a produção de cervejas (WHITEAR & CRABB, 1977).

Na cervejaria tradicional, mostos com 11 a 12% de sólidos solúveis são fermentados para produzir cervejas com 4 a 5% (v v^{-1}) de etanol. Por volta de 1977, a VHG de mostos com teor de sólidos solúveis entre 16 a 18% tornou-se popular devido à várias vantagens, tais como: a melhor eficiência da planta, a redução nos gastos com energia e mão

de obra, a possiblidade de maior uso de adjuntos, a suavidade no sabor, a estabilidade da névoa de leveduras e o aumento do rendimento fermentativo (WHITEAR & CRABB, 1977).

Segundo ROSE & HARRISON (1993), a diluição da cerveja concentrada ao término do processo pode aumentar a produtividade das cervejarias bem como diminuir o custo do produto.

Diferente do processo cervejeiro, nas destilarias e usinas de etanol, os mostos de cereais são, normalmente, fermentados em concentrações de 20 a 24 gramas de sólidos solúveis por 100 gramas de mosto (THOMAS et al. 1996).

O processo de produção citado por THOMAS et al. (1996) foi desenvolvido por Oreste J. Lantero e John J. Fish. No dia 17 de maio de 1991, os inventores depositaram o pedido de patente de um processo para a produção de etanol a partir de matérias-primas que apresentassem açúcares fermentáveis ou constituintes que pudessem ser convertidos em açúcares através dos seguintes passos:

- Liquefação da matéria-prima na presença de uma enzima alfa-amilase para a obtenção de uma "pasta" liquefeita. A quantidade de alfa-amilase utilizada no processo depende de sua atividade enzimática. Geralmente, utiliza-se entre 0,01 e 1 mL de solução da enzima por kg de matéria-prima.
- Sacarificação da pasta liquefeita na presença de uma enzima glucoamilase para a obtenção açúcares fermentescíveis. A quantidade de glucoamilase, utilizada no processo depende de sua atividade enzimática. Geralmente, utiliza-se entre 0,01 e 2 mL de solução da enzima em 450 g de mosto, com concentração de sólidos solúveis entre 20 e 33%.
- Uma enzima protease deve ser adicionada ao mosto durante a sacarificação e/ou durante a fermentação
- Fermentação dos açúcares por leveduras para a obtenção de etanol.
- Recuperação do etanol por destilação.

Uma vez que a fermentação de matérias-primas amiláceas já era realizada com altas concentrações de sólidos solúveis, a VHG para a produção de etanol foi definida como "o preparo e a fermentação completa de mostos contendo 300 ou mais gramas de sólidos solúveis por litro" (THOMAS et al. 1993).

CASEY et al. (1984) verificaram que as limitações para a fermentação de mostos cervejeiros com mais de 18% de sólidos solúveis estavam relacionadas com a carência de nutrientes nos mostos e a baixa concentração de células de leveduras no mosto, mas não com o teor alcoólico ou a pressão osmótica. Neste sentido, suplementando os mostos cervejeiros com extrato de levedura (para prover esterol e ácidos graxos insaturados) e trabalhando com concentrações celulares na ordem de 10^7, CASEY et al. (1984) demonstraram que as leveduras cervejeiras sem nenhuma manipulação genética ou seleção de linhagens, foram capazes de fermentar mostos com 27 gramas de sólidos em 100 gramas, produzindo cervejas cerca de 15% (v v^{-1}) de etanol. O processo de fermentação foi conduzido sob 14°C e durante 5 dias, enquanto os tratamentos não suplementados com extrato de leveduras fermentaram por até 21 dias.

No Brasil, a principal matéria prima utilizada para a produção de etanol é a cana-de-açúcar. Geralmente, a concentração de sólidos solúveis dos mostos varia de 16 a 18 gramas por 100 gramas. Algumas usinas fermentam mostos mais concentrados, contendo 18 a 22% (p v^{-1}) de açúcares totais e produzem vinhos com cerca de 10 a 12% (v v^{-1}) de etanol. As VHG podem ser consideradas como fermentações que utilizam mostos com mais de 25% de sólidos solúveis totais, com o objetivo de atingir concentrações de etanol acima de 15% (v v^{-1}) (THOMAS et al., 1996; FURLAN, 2012).

Caso o caldo possa ser concentrado até 32°Brix (por exemplo), o volume de vinhaça gerado no processo de obtenção do etanol pode diminuir pela metade. Além da diminuição do volume de resíduos, o aumento da

concentração de etanol no vinho também diminui o consumo de vapor nas colunas de destilação, a capacidade da coluna necessária, o número de dornas e pode proporcionar maior excedente de energia durante o processo de obtenção de etanol. Segundo PULIGUNDA et al. (2011), os processos de fermentação com alto teor alcoólico podem diminuir os custos, isso porque cerca de 30% dos custos do processo estão situados na destilação.

Além dos benefícios citados, segundo THOMAS et al. (1996), a concentração do etanol na fermentação pode provocar um efeito repressor sobre as bactérias, e com isso diminuir os gastos com antibióticos e antiespumantes.

A grande limitação para a aplicação da fermentação com alto teor alcoólico são as características das leveduras utilizadas atualmente, que possuem limitada tolerância aos estresses, logo são submetidas a menores concentrações de açúcares e menores concentrações de etanol (8,0% a 9,0%) (BASSO & PAULILLO, 2003; PIDDOCKE et al., 2009; CERQUEIRA, 2013).

Vários fatores desempenham papel importante na diminuição da eficiência e amplitude na fermentação do etanol pelas leveduras, os mais importantes são: 1) toxicidade do etanol; 2) inibição por subprodutos tais como ácidos orgânicos; 3) inibição devido às pressões osmóticas resultantes de altas concentrações de açúcar; 4) inibição por temperaturas elevadas; 5) inibição da fermentação e reforço do crescimento da célula devido à aeração; 6) inibição da fermentação devido a contaminação por bactérias ou outras leveduras, ou por níveis elevados de certos cátions (especialmente em fermentações industriais em grande volume); 7) inibição da fermentação devido à instabilidade da cepa que conduz a formação de mutações ou variantes. De todos os fatores listados acima, o efeito inibitório do etanol sobre as células da levedura é o mais importante na fermentação alcoólica (PANCHAL, 1990).

3.4.1. Fatores inibidores do processo de fermentação com alto teor alcoólico

3.4.1.1. Toxicidade do etanol

Produzido pelas leveduras durante a fermentação, o etanol é um composto amplamente conhecido por suas propriedades antimicrobianas. Nas leveduras, os efeitos tóxicos do etanol envolvem queda de viabilidade celular, inibição do crescimento celular e inibição de vários sistemas de transporte, tais como: o de aminoácido permeases e o do sistema de transporte de hexoses (LEWIS et al., 2010; SANTOS et al., 2008; DE LA TORRE-GONZÁLEZ et al., 2016).

De acordo com INGRAM (1976), o etanol pode atuar na membrana plasmática, alterando sua polaridade e modificando sua fluidez.

Segundo D'AMORE & STEWARD (1987) o etanol desnatura e inibe enzimas glicolíticas, inibe o transporte de açúcares e de aminoácidos, altera a organização e a permeabilidade da membrana celular, e, pode levar a formação de células mutantes. Além disso, também pode levar à perda de cofatores e coenzimas essenciais para a atividade de enzimas envolvidas na glicólise, bem como na produção de etanol.

Segundo ROSE & HARRISON (1993) o etanol atua aumentando o fluxo passivo de hidrogênio através da membrana plasmática, levando a inibição das enzimas ATPase. Ambos os efeito promovem a dissipação do gradiente de prótons ao redor da membrana plasmática, inibindo o transporte de solutos.

PRATT et al. (2003) verificaram que altas concentrações de etanol podem diminuir o volume celular, bem como levar ao enrugamento e até mesmo a mumificação das células de leveduras. Além disso, o grau de inibição do etanol depende da linhagem de levedura utilizada para a fermentação e também de fatores ambientais, como a

temperatura, composição do mosto, presença de contaminantes e a concentração de subprodutos do processo fermentativo.

3.4.1.2. Sub-produtos do processo fermentativo

O processo de fermentação alcoólica produz vários compostos não alcoólicos, os quais podem ser tóxicos às leveduras, conforme suas concentrações no meio. Esses compostos podem ser ácidos orgânicos, furfurais e sais (FAN et al., 2014). Dos ácidos orgânicos produzidos pelas leveduras, o principal é o ácido succínico e está relacionado com o crescimento da levedura (BASSO et al., 1997). De acordo com GOMES (2009), a concentração de ácido succínico ao término do processo fermentativo pode variar de 0,7 a 1,1 mM.

Depois do ácido succínico, o ácido acético é o ácido orgânico produzido em maior volume pelas leveduras. A levedura forma ácido acético para gerar acetil-CoA para a síntese de ácidos graxos, esteroides e aminoácidos (leucina) (GUTIERREZ, 1997).

Durante o processo fermentativo, o pH do mosto pode diminuir em até duas unidades. As causas podem ser: produção de ácido carbônico a partir do CO2; secreção de ácidos orgânicos ao longo da fermentação; e o consumo de compostos tamponantes do mosto, como aminoácidos básicos e fosfatos (GIBSON et al., 2007).

A diminuição do pH ao longo da fermentação pode alterar a capacidade de expressão gênica das leveduras. Linhagens haploides de *S. cerevisiae* submetidas à condições de meio onde o pH diminuiu de pH de 5,5 para 3,5 demonstraram aumento de mais de 1,4 vezes na expressão de 36 genes, relacionados com a formação da parede celular (CWP1, HOR7, SPI1, YGP1), metabolismo de carboidratos (GCY1, GPD1,GPP2/HOR2, GRE3, Hxk1, HXT6, SOL4, TPS1, TSL1), metabolismo redox (ALD2, ALD3, MCR1, YER053C, YNL134C), controle da expressão de genes (CUP1), transporte pelos poros nucleares (GSP2), proteção contra várias condições de estresses (CTT1, DDr2, GRE2, HSP12, HSP42, YLD204W, YDR453C, YMÇ128C), ou codificam proteínas de função desconhecida (GIBSON et al., 2007).

3.4.1.3. Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais interfere no metabolismo dos micro-organismos e as leveduras não são uma exceção (ROSE & HARRISON, 1987).

Diversos estudos realizados em escala laboratorial indicaram a fermentação completa de mostos contendo mais de 38% (m v^{-1}) de sólidos solúveis, produzindo vinhos com concentrações de etanol superiores a 23% (v v^{-1}). No entanto, fermentações em escala laboratorial, geralmente, são conduzidas sob temperatura de 20°C. Essa temperatura é utilizada, pois fermentações com altas temperaturas podem resultar em fermentações inacabadas e a tolerância das leveduras ao etanol tende a diminuir. Esses problemas são mais pronunciados conforme se aumenta a concentração de carboidratos no mosto (JONES & INGLEDEW, 1994).

O aumento da temperatura ao longo da fermentação pode aumentar o efeito tóxico do etanol. Por outro lado, o aumento da concentração de etanol no mosto reduz a temperatura máxima das fermentações e aumenta a temperatura mínima (ROSE & HARRISON, 1993).

Além da tolerância ao etanol, a temperatura também está relacionada com a composição da membrana celular das leveduras. Diversos estudos demonstram que a redução da temperatura pode resultar no aumento da

concentração de ácidos graxos insaturados e com isso reduzir o transporte de solutos. Isto tem por consequência a redução da produtividade do processo fermentativo (ROSE & HARRISON, 1987). Contudo, o efeito desse aumento de ácidos graxos insaturados, principalmente do ácido oleico, pode compensar a perda de fluidez da membrana ocasionada pelo etanol do meio, aumentando assim a tolerância das leveduras ao etanol (YOU, 2003).

3.4.1.4. Pressão osmótica resultantes de altas concentrações de açúcar no substrato

Pressão osmótica é a força com a qual um solvente se desloca de um meio mais concentrado para outro menos concentrado, através de uma membrana semipermeável até se obter o equilíbrio (JOHN et al., 2012).

Na fermentação alcoólica, a pressão osmótica é a pressão exercida pelo mosto sobre a levedura, com a finalidade de estabelecer o equilíbrio entre a concentração de solutos, dentro e fora das células. Quanto maior a concentração de sólidos no mosto, maior será a pressão osmótica (JOHN et al., 2012).

D'AMORE et. al. (1987) verificaram que o aumento da pressão osmótica do meio tende a aumentar a concentração intracelular de etanol nas leveduras, o que leva à diminuição do crescimento celular e da produtividade. No entanto, a suplementação do mosto com combinações de ácidos graxos insaturados, vitaminas e proteínas pode aumentar a tolerância das leveduras. THOMAS et al. (1993) fermentaram mostos de milho com 350 g L^{-1} de sólidos solúveis e produziram 17,1% (v v^{-1}) de etanol em 8 dias de fermentação a 20°C. Suplementando o meio com 0,9% de extrato de levedura, o tempo de fermentação para atingir a mesma concentração de etanol foi de 3 dias.

O valor máximo do estresse osmótico, bem como da tolerância das leveduras ao etanol não está apenas relacionado com a concentração de açúcares. O tipo de açúcar presente no mosto também influência, como pode ser observado no trabalho realizado por DE LA TORRE-GONZÁLEZ et al. (2016). Neste trabalho, foi verificado que em meios contendo apenas frutose, a tolerância das leveduras ao etanol é menor do que em meios contendo apenas glicose. Essa informação talvez possa servir como uma das explicações do porque as fermentações com mosto de milho apresentam maiores concentrações de açúcares do que as fermentações com mosto de cana-de-açúcar realizadas nas usinas.

De acordo com BASSO et al. (2011), a pressão osmótica não é um dos fatores de estresse mais relevantes no processo fermentativo industrial, porque durante o processo de batelada alimentada, com tempo de alimentação de 4 a 6 horas, a concentração total de açúcares nunca excede a faixa de 5-7% (m m^{-1}). No entanto, o estresse osmótico causado pelos sais, presentes em alta concentração no melaço utilizado para o preparo do mosto pode ser prejudicial para o processo fermentativo. Os níveis de potássio, cálcio e magnésio encontrados no mosto excedem largamente o exigido pelas leveduras, chegando ao ponto de estressar as leveduras, induzindo a formação de glicerol, diminuindo assim a concentração de carboidratos de reserva das leveduras, bem como o rendimento fermentativo.

Além do estresse osmótico outro fator que pode aumentar a formação de glicerol é a contaminação bacteriana (BASSO et al. 2011).

3.4.1.5. Contaminação por bactérias e leveduras selvagens

A contaminação por bactérias é um problema permanente na produção comercial de álcool combustível. As bactérias podem tanto produzir compostos inibidores ao processo fermentativo, quanto competir com as leveduras pelo consumo dos açúcares e micronutrientes do mosto (SKINNER & LEATHERS, 2004).

DOLAN (1976) mostrou que níveis de infecção entre 10^6 e 10^7 células de bactérias por mL podem diminuir em 1 a 3% do rendimento fermentativo. Para níveis maiores que 10^8, as perdas em etanol podem ser maiores que 5% e chegar até a 20 % de redução do rendimento fermentativo (ROSE & HARRISON, 1993).

De acordo com GALLO (1990), as principais contaminações observadas na fermentação do caldo de cana-de-açúcar são as fermentações acética, lática, butírica e do dextrânio. A fermentação acética é atribuída principalmente as espécies *Acetobacter aceti*, *A. suboxydans*, *A. pasteurianum*, *A. acetosum*, *A. kuntzengianum* e *A. suboxydans*; a fermentação lática está relacionada principalmente com as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. leischmanii* e *Streptococcus lactis*; e a fermentação butíricas às espécies *Clostridium pasteurianum* e *C. saccharobutyricum*.

A maior proporção das bactérias contaminantes do processo fermentativo para a produção de etanol são bactérias láticas, provavelmente devido à sua maior capacidade em se adaptar às condições debaixo pH e altas concentrações de etanol, quando comparadas com os demais microrganismos (BASSO et al. 2011).

A fermentação lática tem como principais produtos os ácidos lático e acético, etanol e gás carbônico. As fermentações que resultam na formação de ácido lático como produto majoritário são conduzidas por lactobacilos do tipo homofermentativo, enquanto fermentações que além do ácido lático produzem etanol e ácido acético como produtos principais, são realizadas por lactobacilos do tipo heterofermentativo (GOMES, 2009). Além dos produtos citados, estudos recentes vem demonstrando que a produção e excreção de manitol é uma característica exclusiva das bactérias láticas heterofermentativas e é o segundo metabólito mais abundante. (BASSO, 2006; GOMES, 2009).

Segundo MAIORELLA et al. (1983), o ácido lático pode inibir o processo de fermentação alcoólica em concentrações na faixa de 10 – 40 g L^{-1}. De acordo com NGANG et al. (1989), a pressão osmótica do meio e a quantidade de inóculo influenciam o grau de toxicidade do ácido lático. Quanto maior a pressão osmótica, menor é a concentração de ácido lático necessária para inibir a produção de etanol. Em relação ao inóculo, quanto maior for sua concentração, maior a concentração de ácido lático necessária para inibir a produção de etanol (DORTA et al., 2006).

A fermentação acética realizada por bactérias ocorre principalmente quando o mosto fermentado permanece por longo período de tempo à espera da destilação. O ácido acético é solúvel nos lipídios da membrana celular e inibe por interferência química o transporte de fosfato através da membrana (OLIVA-NETO, 1995). Neste sentido, o ácido acético torna-se mais tóxico que o ácido lático.

Segundo GOMES (2009), a concentração de ácido acético necessária para inibir o processo fermentativo é muito maior do que o valor que geralmente é produzido ao longo das fermentações alcoólicas. O vinho precisa apresentar concentração de aproximadamente 17 g L^{-1} de ácido acético para diminuir 20% da produção de biomassa e 38 g L^{-1} para diminuir em 80%. No entanto, o efeito tóxico do ácido acético é acentuado pelo teor alcoólico e apresenta sinergismo com o ácido lático, tornando-se mais tóxico, conforme o aumento da concentração de ácido lático.

Apesar da contaminação bacteriana ser um problema constante na produção de etanol, a indústria dispõe de alguns recursos para diminuir ao máximo a contaminação do processo. O tratamento ácido do creme de leveduras com ácido sulfúrico e o uso de biocidas são medidas que, apesar de apresentarem pontos negativos, conseguem estabilizar níveis de contaminação bacteriana (CAETANO & MADALENO, 2011).

Com o controle da contaminação bacteriana, os principais contaminantes do processo fermentativo passam a serem as leveduras selvagens. Estas, tornam-se dominantes uma vez que muitas linhagens não são afetadas pelos baixos valores de pH, uso de antibióticos, bem como pelos altos teores de açúcares e de etanol no meio (ROSE & HARRISON, 1993).

Devido ao alto custo de resfriamento do mosto, sua esterilização torna-se economicamente inviável. Essa prática favorece o desenvolvimento de leveduras selvagens (Saccharomyces e não Saccharomyces), as quais podem ser responsáveis pela queda na produtividade, bem como por problemas operacionais nas usinas (BASÍLIO et al., 2008).

Segundo BASSO et al. (2011), os principais problemas causados pelas leveduras selvagens no processo fermentativo são: floculação, formação de espuma, baixa produtividade e queda na viabilidade celular durante o reciclo.

A floculação causada pelas linhagens de leveduras selvagens pode diminuir a eficiência da centrifugação, por consequência gerar creme de leveduras menos concentrado, ou seja, mais vinho será enviado ao tratamento ácido. O vinho presente no creme de leveduras apresenta poder tamponante e com isso, as destilarias precisam aumentar a dose de ácido sulfúrico utilizada no tratamento ácido. Isto, por sua vez, aumenta o custo do processo e também pode levar a queda da viabilidade ou até mesmo a morte das leveduras. Além dos prejuízos citados, as leveduras floculantes também podem decantar no fundo dos fermentadores e deixar açúcares residuais no vinho (queda do rendimento fermentativo) ou aumentar o tempo de fermentação (queda da produtividade) (AMORIM et al., 2011).

3.4.2. Avanços em fermentação com alto teor alcoólico

A partir de menores temperaturas de fermentação, aliado a um novo projeto de fermentadores e interligações sem pontos mortos, a Dedini Indústria de Base, juntamente com a Fermentec, disponibilizaram para o mercado uma tecnologia capaz de realizar fermentações com até 16% de teor alcoólico do vinho, sem prejudicar o rendimento do processo (FAPESP, 2010). Este processo foi realizado experimentalmente apenas em planta pilotosemi-industrial, isso devido aos custos de implantação da tecnologia nas unidades em operação.

Adaptando o sistema de batelada alimentada utilizado na produção de saquê, cervejeiros relataram ter conseguido produzir "cerveja" com mais de 25% (v v^{-1}) de etanol (INGLEDEW, 2009).

Apesar de ser sintetizado pelas leveduras, o etanol, acima de determinadas concentrações, apresenta efeito tóxico às leveduras. No entanto, em condições ideais, com adequado suprimento de carboidratos, algumas leveduras (principalmente a *S. cerevisiae*) são capazes de sintetizar altas concentrações de etanol (LEA & PIGGOTT, 1995).

3.5. Adaptação das leveduras às condições de estresse

A adaptação, ou aclimatação, consiste no cultivo sucessivo do micro-organismo em concentrações crescentes de um composto tóxico ou fator de estresse (HAHN-HÄGERDAL et al. 2005).

Três diferentes métodos podem ser utilizados para a adaptação de leveduras (Figura 7). No primeiro método as leveduras são cultivadas em placas de Petri com concentrações crescentes dos compostos tóxicos. Neste método, apenas as colônias mais adaptadas são selecionadas para os próximos ciclos. No segundo método, as leveduras são cultivadas em meio líquido com alimentação por batelada e agitação. Ao término de cada ciclo o mosto fermentado é separado das leveduras e estas são inoculadas em um novo mosto, mais concentrado. No terceiro método, são

utilizados fermentadores operando em regime contínuo e a alimentação é realizada com concentrações crescentes do meio de fermentação (HAHN-HÄGERDAL et al. 2005).

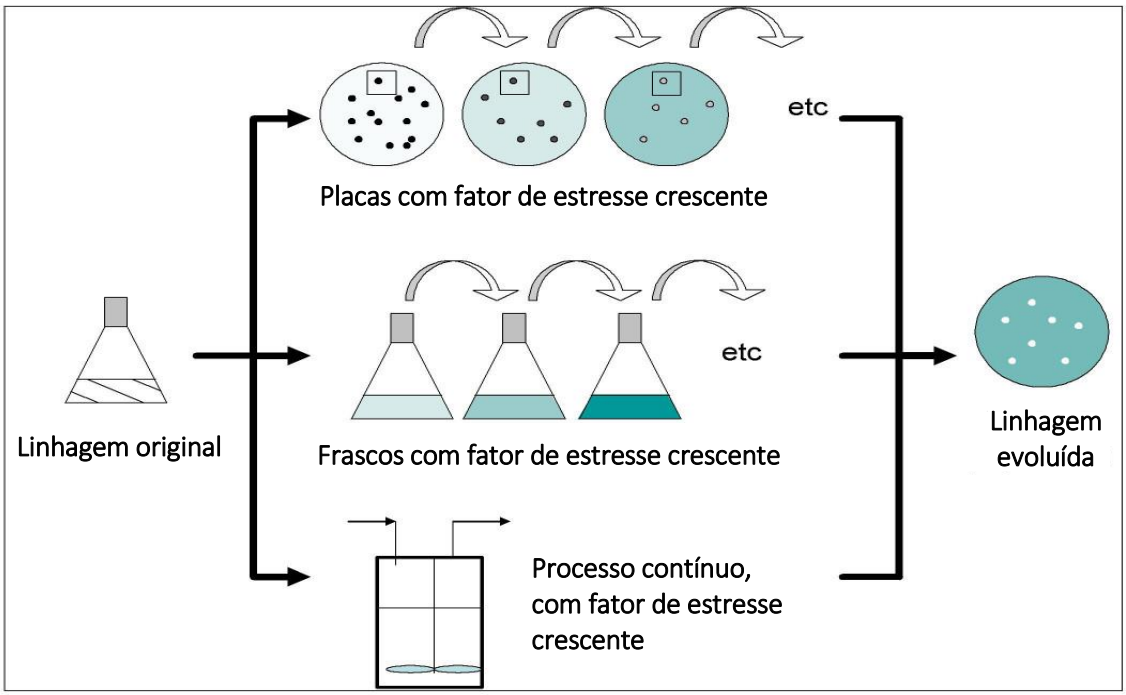

Figura 7. Ilustração dos principais métodos que podem ser utilizados para adaptação das leveduras em fermentações sob condições de estresse

Fonte: HAHN-HÄGERDAL et al., 2005 (Adaptado)

Diferente do primeiro método, onde apenas as leveduras mais resistentes foram selecionadas para o próximo ciclo, no segundo e no terceiro método todas as leveduras permanecem no reator e com o passar do tempo, as leveduras que não tolerarem as condições do meio morrerão e as mais adaptadas prevalecerão no reator.

CARNEIRO (2011) verificou a aclimatação das leveduras aos compostos tóxicos, provenientes do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, proporcionou um aumento de 7 e 50% nos valores de rendimento fermentativo e produtividade, respectivamente.

Testando a adaptação de leveduras ao estresse oxidativo, DAVIES et al. (1995), verificaram que submetendo leveduras à concentração de 0,8 mM de peróxido de hidrogênio por um período de duas horas, o crescimento de novas células é fortemente afetado. No entanto, pré-expondo as células a concentrações baixas de peróxido de hidrogênio (0,4 mM), as leveduras são capazes de sobreviver e se multiplicar normalmente quando submetidas a concentração de 0,8 mM.

VITOR (2014), verificou que cultivando a levedura PE-2 em meio de cultivo com concentrações crescentes de açúcares (9 a 24°Brix), essas leveduras foram capazes de realizar fermentações com altos teores de açúcares, sem promover morte celular ou redução visível da produtividade.

Para análise dos compostos formados pelas leveduras em fermentações sob condições de altas concentrações de açúcares, várias técnicas analíticas podem ser utilizadas, dentre essas, destacam-se, a cromatografia de troca iônica (EITEMAN & CHASTAIN, 1997).

3.6. Cromatografia de Íons

A cromatografia de íons, ou cromatografia de troca iônica é uma subdivisão da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De acordo com a ETTRE (1993), a cromatografia de íons é definida como: "separação baseada nas diferenças das afinidades de troca iônica dos analítos individuais. Se íons inorgânicos são separados e podem ser detectados por detectores de condutividade ou por detecção ultravioleta (UV) indireta, então, esta também é chamada de cromatografia de íons".

Segundo EITH et al. (2006), a definição citada por ETTRE (1993) não é completa, uma vez que além separação por troca iônica, a cromatografia de íons também engloba os princípios de separação de íons por formação de par iônico e exclusão de íons. Além disso, a cromatografia de íons permite tanto a análise de íons inorgânicos, quanto orgânicos.

A cromatografia de íons é uma técnica sensível e seletiva aplicada para a separação cátions, ânions, carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos, mesmo em baixas concentrações, em coluna específica, seguida pela detecção em detector amperométrico, de condutividade ou UV/VIS (METROHM, 2016 a,b).

A área de aplicação mais importante da cromatografia de íons, hoje, é na análise de água potável e no controle de ultra-traços em processos de reagentes ultrapuros requeridos principalmente na indústria de semicondutores (EITH et al., 2006). No entanto, nos últimos anos, essa tecnologia começou a ser introduzida nas destilarias, uma vez que pode proporcionar o controle mais preciso dos processos, em relação aos métodos tradicionalmente utilizados.

HAMLEY-BENNETT et al. (2016), utilizaram a cromatografia de íons para a análise do consumo de glicose, no processo de fermentação de mostos produzidos a partir da polpa da beterraba-sacarina. Para tal, foram preparados dois mostos, o primeiro utilizando a polpa da beterraba-sacarina e segundo utilizando glicose (controle). As concentrações de glicose e polpa de beterraba sacarina nos mostos foram iguais a 16 g L^{-1}. Os resultados mostraram que nos mostos preparados com a polpa da beterraba-sacarina foram consumidos 155 mg de glicose, enquanto nos mostos preparados com glicose foram consumidos apenas 134,39 mg de glicose.

EITEMAN & CHASTIN (1997) utilizaram a cromatografia de íons para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos pela fermentação das bactérias anaeróbicas *Fibrobacter succinogenes* e *Clostridium coccoides*. Os resultados mostraram que nas fermentações realizadas pela bactéria *Fibrobacter succinogenes*, foram produzidos 5,52 mM de ácido succínico, 0,12 mM de ácido fórmico, 1,5 uM de ácido fumárico e 2,26 mM de ácido acético. Nas fermentações realizadas pelas bactérias *Clostridium coccoides*, foram produzidos 0,36 mM de ácido málico, 0,45 mM de ácido succínico, 1,51 mM de ácido lático, 2,2 uM de ácido fumárico e 4,48 mM de ácido acético.

As condições adversas enfrentadas pelos micro-organismos, tais como altas contrações de etanol e demais metabólitos produzidos no processo de fermentação, podem afetar as estruturas celulares, levando a alteração de sua morfologia (FOLCH-MALLOL et al., 2004). Neste contexto, a microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta que pode auxiliar na identificação das alterações morfológicas dos microrganismos (CASTRO, 2002).

3.7. Microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura foi inserido no mercado em 1965 e desde então se tornou essencial para muitos tipos de pesquisas biológicas, contribuindo para a classificação e taxonomia de insetos e fungos, estudo da morfologia de pólen e em pesquisas de superfícies de diversas estruturas de plantas e animais, permitindo aumentos de 10 vezes até 100 mil vezes (GALLETI, 2003; VITOR, 2014).

O princípio do microscópio de eletrônico de varredura consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Através de bobinas de solenóides o feixe de elétrons pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra (DEDAVID et al., 2007). A Figura 8 compara o funcionamento do microscópio óptico com o microscópio eletrônico de varredura.

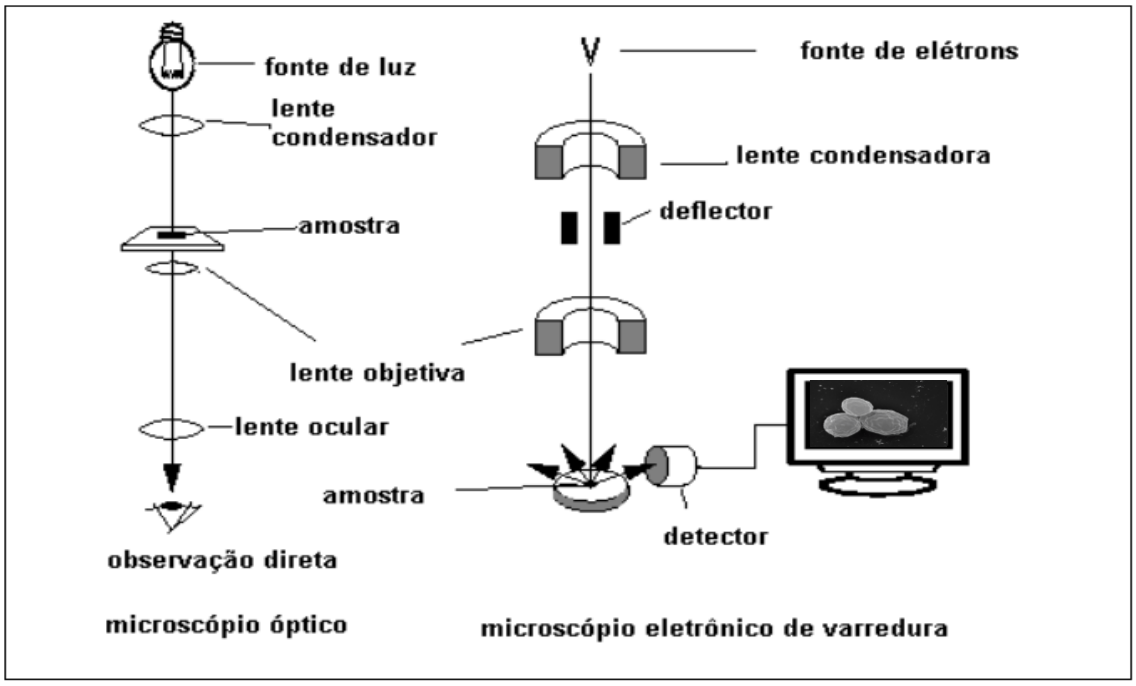

Figura 8. Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura
Fonte: DEDAVID et al., 2007 (Adaptado).

VITOR (2014) realizou análises por microscopia eletrônica de varredura para verificar o efeito do estresse proporcionado pela fermentação com alto teor alcoólico sobre a parede celular das células de leveduras. Neste estudo foi verificado que a levedura PE-2 adaptada para fermentar em mostos com altos teores de açúcares, não sofreu alterações morfológicas significativas em sua parede celular. No entanto, quando inoculadas diretamente em meio com alto teor de açúcar (sem o processo de adaptação), as células apresentaram diferenças morfológicas significativas. As principais diferenças foram o formato alongado da célula e o aspecto mumificado (enrugado), indicando que essas células sofreram danos por estresse osmótico.

Em estudo semelhante, realizado por BENNIS et al. (2004), no entanto, com o objetivo de verificar o efeito fungicida dos óleos essenciais timol e eugenol, sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi possível verificar nitidamente o efeito dos fatores de estresse sobre a morfologia da levedura, como pode ser observado na Figura 9.

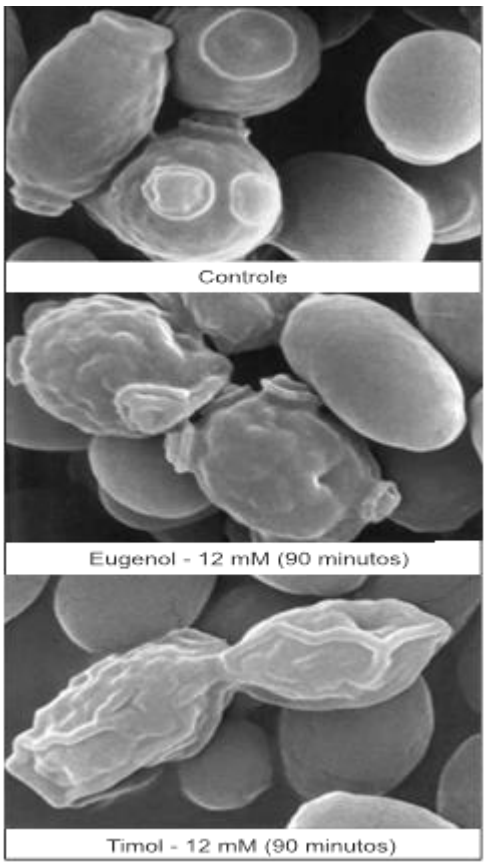

Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetida aos tratamentos com eugenol e timol por 90 minutos.

Fonte: BENNIS et al. 2004.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Primeira etapa: Definição do sistema de alimentação do mosto para as fermentações com alto teor alcoólico

Para definir o melhor sistema de alimentação de mosto para as fermentações pelas leveduras na condição de laboratório, foi realizado um ensaio preliminar. Neste ensaio foi avaliado o comportamento dos tratamentos T1 e T2 ao longo de 8 ciclos fermentativos, conforme descrito na Tabela 2.

T1 – Alimentação por batelada simples: Após o reciclo das leveduras, o mosto foi totalmente adicionado sobre o creme de leveduras.

T2 – Alimentação conforme o consumo do substrato: Neste sistema, o mosto foi fracionado em cinco alimentações.

Tabela 2. Concentrações de sólidos solúveis dos mostos utilizados em cada ciclo fermentativo

Ciclo	ART (g L^{-1})
1	50
2	100
3	150
4	180
5	200
6	240
7	260
8	280

Os mostos utilizados nesta etapa foram preparados a partir de melaço de cana-de-açúcar e água destilada. Para a clarificação do melaço foi realizado o seguinte procedimento:

- Diluir o melaço para 35°Brix;
- Ferver por 15 minutos;
- Esperar esfriar e filtrar com algodão;
- Adicionar 2,5 g L^{-1} de fosfato de sódio monobásico;
- Transferir para frasco de Erlenmeyer e tampar com algodão e papel absorvente;
- Autoclavar a 120°C e 1 atm por 15 minutos;
- Manter o frasco de Erlenmeyer em repouso por 48 horas;
- Sifonar o sobrenadante e repetir o procedimento de autoclavagem para sua esterilização.

As fermentações foram conduzidas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL de mosto. A temperatura estabelecida para a fermentação foi de 28°C e 80 rpm de agitação.

Nesta etapa foi utilizada a linhagem de levedura MYCOFERM C22 da empresa italiana EVERINTEC, em concentração de 3% (massa/volume), totalizando 9 g por frasco de Erlenmeyer. A concentração de açúcares dos mostos foi aumentada a cada ciclo até atingir 28°Brix.

4.2. Segunda etapa: Adaptação das leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico

Após a definição do melhor sistema de alimentação de mosto para a adaptação das leveduras em meio com alto teor alcoólico, foi realizada uma segunda etapa do projeto que consistiu na adaptação das leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico.

Para verificar o efeito da adaptação das leveduras para a realização da fermentação com alto teor alcoólico foram realizados 9 ciclos fermentativos, utilizando as leveduras comerciais MYCOFERM C22 e Y904. Para conduzir esse ensaio, em cada ciclo foram realizados 2 tratamentos (linhagens C22 e Y904), com 5 repetições, conforme apresentado na Tabela3.

Os mostos utilizados nesta etapa foram preparados a partir da mistura de de xarope de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina Granelli, com água destilada. As fermentações foram conduzidas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL de mosto. A temperatura estabelecida para a fermentação foi de 28°C e 80 rpm de agitação.

Para a condução da fermentação foi utilizado o sistema de alimentação por batelada simples.

Tabela 3. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e concentração de açúcares dos mostos ao longo dos ciclos fermentativos.

Levedura	Ciclo	°Brix	Glicose ($g\ L^{-1}$)	Frutose ($g\ L^{-1}$)	Sacarose ($g\ L^{-1}$)	ART ($g\ L^{-1}$)
Y904	1	6	5,99	6,27	41,88	54,14
C22	1	6	5,99	6,27	41,88	54,14
Y904	2	11,2	18,80	18,00	86,78	123,58
C22	2	11,2	18,80	18,00	86,78	123,58
Y904	3	14,9	22,46	22,34	91,85	136,65
C22	3	14,9	22,46	22,34	91,85	136,65
Y904	4	18,2	24,39	26,91	121,07	165,44
C22	4	18,2	24,39	26,91	121,07	165,44
Y904	5	22,7	30,42	33,56	151,00	206,34
C22	5	22,7	30,42	33,56	151,00	206,34
Y904	6	25,3	33,90	37,41	168,29	229,98
C22	6	25,3	33,90	37,41	168,29	229,98
Y904	7	27,7	37,12	40,95	184,26	251,79
C22	7	27,7	37,12	40,95	184,26	251,79
Y904	8	30,2	40,47	44,65	200,89	274,52
C22	8	30,2	40,47	44,65	200,89	274,52
Y904	9	30,2	40,47	44,65	200,89	274,52
C22	9	30,2	40,47	44,65	200,89	274,52

4.3. Terceira etapa: Fermentação com alto teor alcoólico

Após a adaptação das leveduras comerciais Y904 e C22, foi realizado um novo ciclo fermentativo, utilizando mosto com 274,52 g L^{-1} de ART.

O objetivo desta fermentação foi comparar o desempenho das leveduras adaptadas, com as leveduras não adaptadas. Para tal, foram realizados quatro tratamentos, com quatro repetições cada (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição dos tratamentos conduzidos com as fermentações com alto teor alcoólico.

Tratamento	Descrição dos tratamentos
T1	Levedura Y904 adaptada
T2	Levedura C22 adaptada
T3	Levedura Y904 não adaptada
T4	Levedura C22 não adaptada

A Figura 10 ilustra a cinética de condução dos ciclos fermentativos, realizados ao longo das etapas de escolha do sistema de alimentação, adaptação das leveduras e fermentação com alto teor alcoólico.

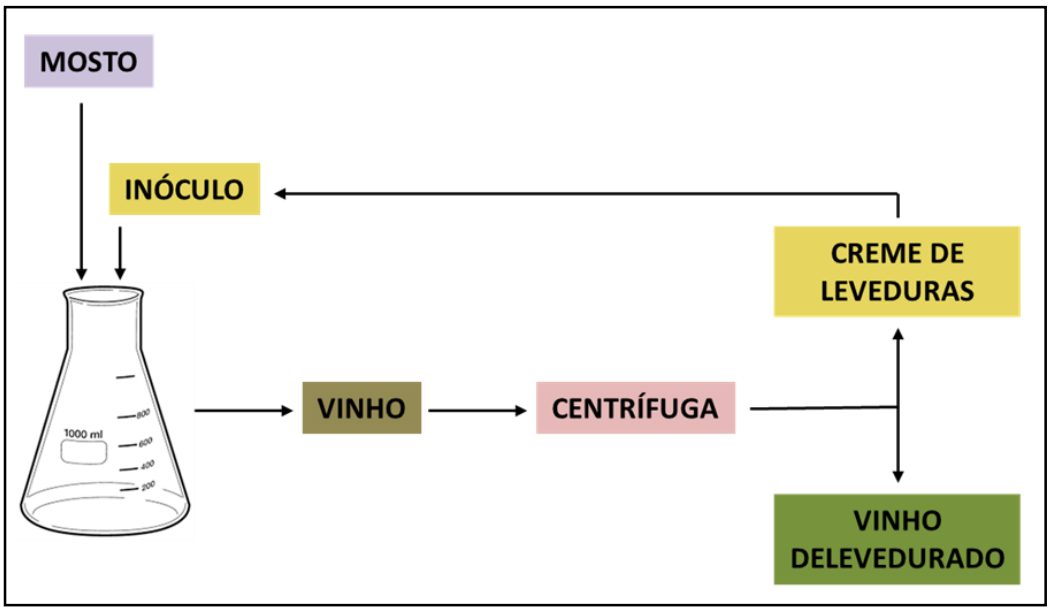

Figura 10. Cinética das fermentações realizadas no experimento.

4.4. Análises microbiológicas

4.4.1. Viabilidade celular

As análises de viabilidade celular foram feitas pelo método de coloração com solução de azul de metileno 0,1%, descrito por Pierce (1970). A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico (com aumento em objetiva de 40X e em ocular de 10 X), com o auxílio da Câmara de Neubauer. A Figura 10 ilustra o procedimento da análise de viabilidade celular.

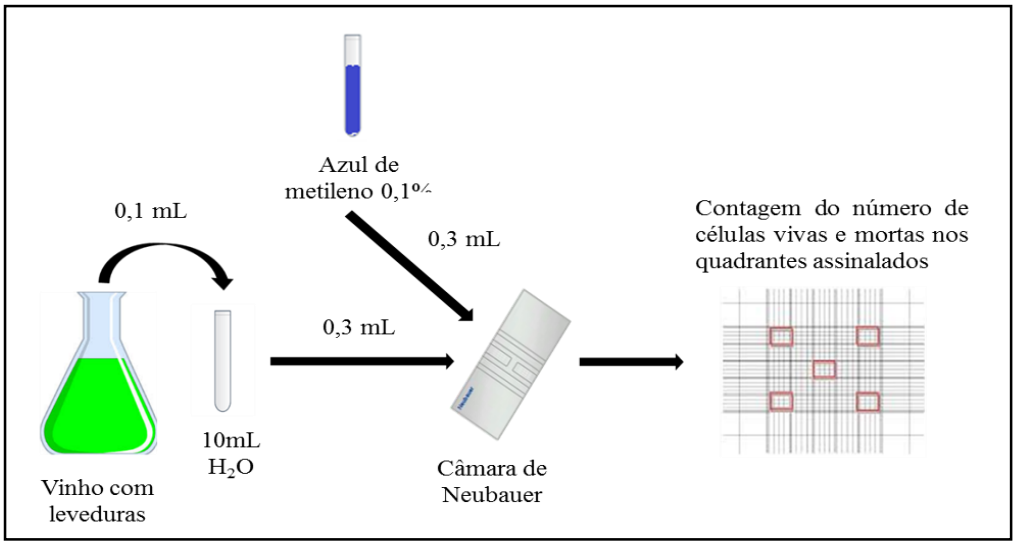

Figura 11. Esquema demonstrando como era preparada a amostra de mosto para a análise de viabilidade celular das leveduras.

Após a contagem do número de células vivas e mortas, a viabilidade foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Número de Células Vivas}}{\text{Número de Células Mortas}}$$

4.4.2. Concentração celular

A câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes, de medidas conhecidas. Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C (Figura 11), que juntos formam um quadrado maior.

A área total compreendida pelos 9 quadrantes é de 9 mm^2, sendo que cada quadrante (A, B e C) são quadrados de 1 x 1 mm. Ao ser colocada a lamínula (especial para ser usada na câmara de Neubauer) a distância entre lamínula e a lâmina (profundidade) mede 0,1 mm, o que permite obter um volume de 0,1 mm^3 em cada quadrante.

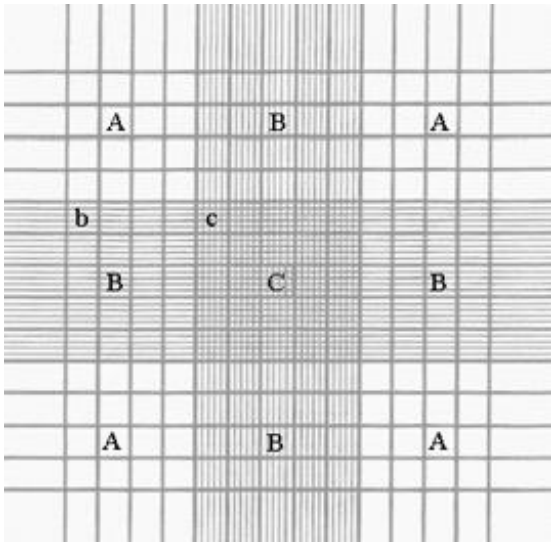

Figura 12. Ilustração dos quadrantes de uma Câmara de Neubauer

Com base no número médio de células por quadrante, no volume do quadrante e na diluição realizada para a leitura no microscópio, a concentração celular foi calculada com a seguinte fórmula:

Concentração (Células mL^{-1}) = Números de Células Vivas x 1,01 x 10^7

Fonte: Autoria própria

4.4.3. Biomassa de leveduras

A biomassa de leveduras foi calculada com base no volume de levedura, conforme AMORIM et al., 1982. Neste método, 100 mL de vinho foram centrifugados à 2917,90 g, durante 10 minutos, ao término da centrifugação o volume de biomassa (úmido) foi medido e relacionado com o volume total da amostra. Os resultados foram expressos em mL/mL (ZAGO et al., 1996).

4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises através de microscopia eletrônica foram realizadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura, modelo LEO 435 VP, do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Após a centrifugação das amostras para a análise da biomassa, uma alíquota do creme de leveduras foi recolhida e armazenada em Ependorf de 0,5 mL com adição do fixador Karnovisky modificado, composto de glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, $CaCl_2$ 0,001M. Em seguida, as

amostras foram armazenadas em refrigerador, até serem utilizadas. Este procedimento foi realizado em amostras de leveduras coletadas nos ciclos 1; 2; 5 e 8 de adaptação e nos quatro tratamentos da fermentação com alto teor alcoólico.

4.4.4.1. Preparo das amostras para a visualização no MEV

Os procedimentos adotados foram:

- Em uma lâmina foi colocada uma gota de poly-L-lisina, aguardado 20 minutos e retirado o excesso;
- Retirado o excesso de poly-L-lisina foi colocado uma gota da amostra na lâmina, aguardado 30 minutos e retirado o excesso de amostra com solução de etanol 30%;
- Após o preparo das lâminas, estas foram colocadas em uma gaiola, com separação entre lamínulas e foi realizada a desidratação das amostras em soluções de etanol 30%, 50%, 70% por 30 minutos, etanol 90% por duas horas e etanol 100% por 30 minutos três vezes;
- As amostras desidratadas foram secadas ao ponto crítico (CO_2), com o auxílio de um secador de ponto crítico, marca LEICA, modelo EM CPD300;
- As laminas foram fixadas nos stubs e submetidas ao processo de metalização, em metalizador, marca Bal-Tec, modelo SCD-050.
- As visualizações das amostras ao MEV foram realizadas em aumentos de 5.000, 10.000, 15.000 e 25.000 vezes.

4.5. Análises Físico-químicas

4.5.1. Determinação de sacarose, frutose, glicose, glicerol e manitol no mosto e no vinho.

Os teores de sacarose, frutose, glicose, glicerol e manitol foram determinados por cromatografia iônica, utilizando cromatógrafo de íons, marca Metrohm modelo 930 Compact IC Flex, com detector amperométrico e coluna Metrospec Carb 1. Para a análise, foi utilizada uma solução de NaOH 100 mmol L^{-1} como eluente, em velocidade de fluxo de 1 mL min^{-1}, sob temperatura do forno de 35°C.

4.5.2. Determinação de etanol nos vinhos delevedurados

Os volumes de 300 mL de vinhos coletados durante os ensaios, a partir de cada unidade experimental, foram centrifugados a 2917,90 g, durante 10 minutos, em seguida, 25 mL do vinho delevedurado (sobrenadante) foram transferidos para o injetor de um microdestilador para álcool, modelo TE-012 (Sarge aparelhos científicos LTDA) e destilados por arraste em vapor, recolhendo-se 25 mL do destilado, em balão volumétrico. As amostras destiladas foram transferidas para um densímetro digital marca Schimidt Haensch, modelo EDM 5000. As densidades obtidas no equipamento foram convertidas em concentração, conforme ZAGO et al. (1996).

4.5.3. Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na concentração de açúcares redutores totais e na concentração de etanol no vinho delevedurado. Com base na relação estequiométrica da fermentação alcoólica, foi considerado que 100 % de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais.

4.5.4. Produtividade de etanol

Com base na concentração de etanol do vinho ao final da fermentação e no tempo de fermentação, foi calculada a produtividade, em mililitros de etanol por litro por hora (mL L^{-1} h^{-1}).

4.5.5. Refratometria na escala Brix

A quantidade de sólidos solúveis presentes nas amostras foi avaliada de acordo com SPENCER E MEADE (1945) em refratômetro digital de bancada Atago Mod. PR-101.

4.5.6. Concentração de ácidos orgânicos no vinho delevedurado

Os teores dos ácidos acético, lático, succínico, fórmico e aconítico foram quantificados por cromatografia iônica, utilizando cromatógrafo de íons, marca Metrohm modelo 930 Compact IC Flex, com detector de condutividade, supressor químico e coluna Metrosep Organic 250/7.8. Para a análise, foi utilizada a solução 0,5 mM Ácido Sulfúrico + 15% Acetona, como eluente, sob a velocidade de fluxo de 1 mL min^{-1} e temperatura ambiente (25°C).

4.6. Delineamento experimental

Para analisar o processo de adaptação das leveduras ao alto teor alcoólico, foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 2x9, para verificar a interação dos efeitos "Ciclo" (concentração de açúcares do mosto) e "Linhagem" de levedura utilizada. No total foram avaliados 20 interações com cinco repetições cada.

Para analisar o processo de fermentação alcoólica, foi utilizado um delineamento inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 4x2, para verificar a interação dos efeitos "Linhagem" e "Adaptação" das leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico.

4.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando o pacote estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1985).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Definição do sistema de alimentação do mosto para realizar em bancada as fermentações com alto teor alcoólico

Comparando os sistemas de alimentação para a condução da fermentação, batelada alimentada intermitente (BATI) e batelada simples (BS), este último sistema proporcionou maior produção de etanol nos ciclos 1; 2; 7 e 8 (11; 5; 4,6; e 3,3%, respectivamente). Contudo, nos ciclos fermentativos iniciais e finais, o sistema de alimentação por batelada simples apresentou melhor resultado do que o Sistema BATI. Isso pode indicar que esse sistema favoreceu a produção de etanol nas condições de maior estresse osmótico. Nos ciclos 1 e 2, o estresse pode estar relacionado a reativação das leveduras. Nos ciclos 7 e 8, o estresse está relacionado com o estresse osmótico e a concentração de etanol do meio.

Em relação a viabilidade celular, do ciclo 2 ao ciclo 6 as leveduras coletadas nas fermentações alimentadas por batelada simples apresentaram viabilidade celular maior do que aquelas do sistema BATI (diferença menor que 5%). Nos ciclos 7 e 8, a viabilidade foi maior para os tratamentos submetidos ao sistema BATI e as diferenças foram 3,2% e 25,4%, respectivamente. Essas diferenças sugerem que o sistema BATI pode reduzir o estresse osmótico das células, aumentando assim sua viabilidade.

Além da viabilidade celular, o consumo dos açúcares e a produtividade da fermentação também são indicadores de estresse celular, principalmente para o processo industrial. Neste experimento, a análise dos açúcares residuais (Tabela 5) demonstrou que a concentração de ART no vinho, foi menor do que 7 g L^{-1} para ambos os sistemas de alimentação, até o ciclo 5. No entanto, as concentrações médias de ART dos vinhos nos ciclos 6; 7 e 8 foram iguais a 26; 25,9 e 35,7 g L^{-1}, respectivamente. As altas concentrações de ART nos vinhos, indicam que as células estão sob condições de estresse celular, principalmente nos tratamentos alimentados pelo sistema BATI. As concentrações de ART nos vinhos fermentados pelo sistema BATI, nos ciclos 7 (36,62 g L^{-1}) e 8 (45,6 g L^{-1}) foram 109% (em média) superiores as concentrações de ART verificadas para o sistema BS.

Tabela 5. Teor alcoólico, viabilidade, produtividade e concentração de açúcares em amostras de vinhos ao término dos ciclos fermentativos.

Ciclo	Sistema Alimentação	ART Mosto (g L^{-1})	Etanol (°GL)	Viabilidade (%)	Frutose (g L^{-1})	Glicose (g L^{-1})	ART Vinho (g L^{-1})	Produtividade (°GL L^{-1} h^{-1})
1	BS	50	3,23	88,33	0,67	0,34	1,01	1,08
1	BATI	50	2,91	88,33	1,43	0,65	2,08	0,97
2	BS	100	5,75	93,39	1,57	0,65	2,22	1,01
2	BATI	100	5,61	88,71	3,34	0,65	3,99	0,84
3	BS	150	8,35	91,72	15,37	0,69	16,06	0,96
3	BATI	150	11,74	91,68	3,12	0,65	3,77	0,89
4	BS	180	10,33	90,74	3,55	0,65	4,20	0,90
4	BATI	180	10,96	90,00	4,33	0,65	4,98	0,84
5	BS	200	12,78	90,81	6,41	0,71	7,12	0,82
5	BATI	200	12,84	89,90	3,22	0,68	3,90	0,63
6	BS	240	14,15	87,51	29,72	0,77	30,49	0,73
6	BATI	240	14,39	85,06	20,73	0,79	21,52	0,82
7	BS	260	15,69	85,00	13,79	1,37	15,16	0,97
7	BATI	260	15,00	87,78	33,75	2,87	36,62	0,87
8	BS	280	16,12	60,57	24,17	1,64	25,81	0,85
8	BATI	280	15,60	81,25	43,79	1,81	45,60	0,68

Por outro lado, nos ciclos 7 e 8, as produtividades das fermentações alimentadas por batelada alimentada intermitente (BATI), apresentaram-se em média de 15,2 % menores do que nas fermentações alimentadas por batelada simples.

Com base nos resultados obtidos, o sistema de alimentação por batelada simples foi escolhido para a adaptação das leveduras ao processo de fermentação com alto teor alcoólico em escala laboratorial neste projeto.

5.2. Adaptação das leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico

5.2.1. Viabilidade

Ao longo do processo de adaptação das leveduras, apenas a linhagem C22 apresentou viabilidade constante em todos os ciclos fermentativos. No ciclo 9, a viabilidade celular das leveduras da linhagem C22 não diferiu estatisticamente ($p<0,05$) da viabilidade celular dessa linhagem nos ciclos 1; 5; 6; 7 e 8.

Utilizando a linhagem de levedura Pedra 2 para a fermentação de mostos com concentrações crescentes de açúcares (95 a 232 g L^{-1}), VITOR (2014) verificou que a viabilidade das leveduras não diferiu estatisticamente ao longo

dos ciclos fermentativos, mantendo-se constantes em 93,52%. Apesar deste valor ser maior do que o apresentado pela linhagem C22, neste trabalho (82,81%), o comportamento das linhagens foi semelhante, pois em ambos os casos, a viabilidade celular observada no último ciclo fermentativo, foi semelhante a viabilidade do primeiro ciclo fermentativo.

Em relação às leveduras da linhagem Y904, a viabilidade manteve-se constante até o ciclo 4. Após este ciclo, a viabilidade celular dessa linhagem caiu ciclo após ciclo, chegando à aproximadamente 34% no último ciclo fermentativo, como pode ser observado na Tabela 6. A queda de viabilidade observada pode estar relacionada ao aumento da concentração de ART do mosto. No ciclo 4, a concentração de ART do mosto foi de 165,44 g L^{-1}. Nos demais ciclos, as concentrações de ART dos mostos foram superiores a 200 g L^{-1}, chegando a 274,52 g L^{-1} no ciclo 9.

Tabela 6. Viabilidade celular (%) das leveduras ao término dos ciclos fermentativos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Linhagem	Viabilidade Celular (%)								
	Ciclo Fermentativo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y904	76,74^{Bab}	83,45^{Aa}	82,83^{Aa}	85,97^{Aa}	67,74^{Bbc}	65,14^{Bcd}	62,13^{Bcd}	55,57B^{d}	33,85^{Be}
C22	83,20^{Aabc}	89,40^{Aa}	86,40^{Aab}	88,23^{Aab}	80,59^{Aabc}	80,01^{Aabc}	78,78^{Abc}	82,65^{Abc}	76,04^{Ac}

^{ABabcde}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey com nível de 5% de significância.

BAYROCK & INGLEDEW (2001), realizaram fermentações contínuas em mostos com concentrações de glicose variando de 15,2% a 31,2%. No tratamento com 31,2% de glicose, a viabilidade celular final da fermentação foi inferior a 40%. Nos demais tratamentos, a viabilidade foi superior a 75%.

O comportamento da linhagem Y904, bem como das leveduras utilizadas por BAYROCK & INGLEDEW (2001), mostram que o processo de adaptação pode variar de acordo com a linhagem utilizada. Isso indica um limite genético na capacidade de adaptação das leveduras.

De acordo com LOPES (2015), no processo industrial de produção de etanol, não são desejadas fermentações com viabilidade celular acima de 85%. Isso porque maiores viabilidades tendem a uma maior produção de biomassa e consequentemente a uma menor produção de etanol. Neste sentido, a viabilidade celular das leveduras da linhagem C22 se encontraram dentro da faixa considerada interessante por esse pesquisador. Quanto a linhagem Y904, a viabilidade celular se manteve em valores aceitáveis até o ciclo 4.

Apesar da linhagem Y904 ter apresentado viabilidade inferior à da C22, em meios com altas concentrações de açúcares, a viabilidade de ambas as linhagens foi semelhante até o ciclo 4. É importante lembrar que a concentração de açúcares do mosto no ciclo 4 foi maior do que as concentrações de ART médias utilizadas nas usinas (160 g L^{-1}).

5.2.2. Biomassa e concentração celular

Apesar da viabilidade média da linhagem C22 (82,81%) ter sido maior do que à da linhagem Y904 (68,16%), a linhagem C22 também apresentou maior produção de biomassa apenas no ciclo 1.Nos ciclos 3 e 4, a produção média de biomassa da linhagem Y904 foi de 13,23 g L-1, ao passo que a produção média de biomassa da linhagem C22 foi

9,98 g L^{-1}. Nos demais ciclos, a produção de biomassa foi semelhante, com valor médio de 11,64 g L^{-1} e constante para as duas linhagens (Tabela 7).

Tabela 7. Biomassa de leveduras ao término dos ciclos fermentativos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Linhagem	Biomassa (%)								
	Ciclo Fermentativo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y904	8,69^{Bb}	11,37^{Aab}	12,99^{Aa}	13,48^{Aa}	12,57^{Aab}	12,30^{Aab}	11,94^{Aab}	13,51^{Aa}	10,75^{Aab}
C22	12,07^{Aa}	10,93^{Aa}	9,15^{Bb}	10,82^{Bb}	11,09^{Aa}	12,80^{Aa}	10,11^{Aa}	11,53^{Aa}	10,81^{Aa}

^{ABab}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Segundo VITOR (2014), ao longo dos ciclos fermentativos de adaptação da levedura Pedra 2, a produção de biomassa aumentou de 9,37% para 12% (v v^{-1}) e se estabilizou nessa concentração de biomassa. Esses resultados foram semelhantes aos verificados por LALUCE et al. (2009). Além disso, ambos corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

Em outra pesquisa conduzida por CERQUEIRA (2013), a produção de biomassa ao longo de seis ciclos fermentativos, utilizando mostos com 30°Brix, aumentou de 7% para 13% (m v^{-1}).

A concentração celular foi maior do que a 10^9 células por mL para ambas as linhagens, em todos os ciclos. Exceto, no ciclo 9, no qual a linhagem Y904, apresentou concentração celular de 10^8 células por mL, o que pode ser explicado pela perda de viabilidade celular.

Nos trabalhos realizados por PEREIRA et al. (2011) e BAYROCK & INGLEDEW (2001), as concentrações máximas de células de leveduras foram de 8,2 x 10^8 e 1 x 10^8 células por mL, respectivamente. Neste sentido, mesmo diminuindo a concentração celular no ciclo 9, a linhagem Y904 continuou apresentando valores de biomassa celular altos em relação aos resultados obtidos pelos autores supracitados. Isso indicou que a linhagem Y904 perdeu sua capacidade de sobrevivência à condição de meio que foi submetida, ou seja, a perdeu sua capacidade de adaptação.

5.2.3. Açúcares Residuais no vinho

Analisando-se as concentrações de glicose, frutose e sacarose no vinho delevedurado, verifica-se que não foi observada a presença de sacarose nos vinhos finais das fermentações estudadas. Isso demonstra que as leveduras foram capazes de inverter toda a sacarose, presente no mosto, em glicose e frutose. No entanto, a presença de glicose e frutose no vinho, indica que as leveduras não foram capazes de metabolizar toda a glicose e a frutose disponível no meio.

Na Tabela 8, pode-se verificar que as concentrações de glicose nos vinhos obtidos nas fermentações realizadas com as linhagens C22 e Y904 foram semelhantes até o ciclo 5. O valor médio das concentrações de glicose foi de 0,49 g L^{-1}. Nos ciclos 6; 7; 8 e 9, as fermentações realizadas com a levedura Y904, apresentaram maiores

concentrações de glicose residual no vinho do que as fermentações realizadas com a levedura C22. Nos ciclo 6 e 7, os vinhos gerados pela fermentação realizada pela levedura Y904 apresentaram 5,09 e 7,8 g L^{-1} de glicose a mais do que os vinhos gerados pela fermentação da levedura C22. No ciclo 9, essa diferença aumentou para 11 g L^{-1}. Isto demonstra que a levedura C22, apresentou maior habilidade para realizar fermentações com altos teores alcoólicos no vinho.

Tabela 8. Concentrações de glicose e frutose residuais no vinho, durante os ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Açúcar	Linhagem	Ciclo Fermentativo								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glicose (g L^{-1})	Y904	$0,06^{Ac}$	$0,09^{Ac}$	$0,22^{Ac}$	$0,07^{Ac}$	$3,41^{Abc}$	$5,95^{Abc}$	$8,90^{Ab}$	$30,77^{Aa}$	$24,72^{Aa}$
	C22	$0,08^{Aa}$	$0,09^{Ab}$	$0,23^{Ac}$	$0,03^{Ac}$	$0,60^{Ac}$	$0,86^{Bc}$	$1,10^{Bc}$	$26,41^{Ac}$	$13,60^{Bc}$
Frutose (g L^{-1})	Y904	$0,11^{Ag}$	$0,26^{Ag}$	$0,45^{Ag}$	$5,28^{Bf}$	$22,20^{Ae}$	$34,82^{Ad}$	$51,33^{Ac}$	$111,22^{Aa}$	$87,25^{Ab}$
	C22	$0,28^{Ag}$	$0,31^{Ag}$	$0,33^{Ag}$	$9,68^{Af}$	$17,34^{Be}$	$26,59^{Bd}$	$44,78^{Bc}$	$96,27^{Ba}$	$86,378^{Ab}$

^{ABabc}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna (para o mesmo Açúcar) diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

A partir do ciclo 4, a concentração de frutose do vinho proveniente da fermentação realizada pela linhagem Y904 foi, em média, 12% maior do que o teor desse açúcar observado no vinho fermentado pela linhagem C22. Em ambos os casos, a concentração de frutose residual no vinho aumentou ciclo após ciclo.

No ciclo 6 (230 g L^{-1} de ART no mosto), a concentração de açúcares residuais no vinho proveniente das fermentações realizadas com as leveduras das linhagens Y904 e C22 foram respectivamente 39,10 g L^{-1} e 27,6 g L^{-1}. Em pesquisa realizada por Vitor (2014), utilizando a levedura Pedra-2 para a fermentação de mosto com 232,35 g L^{-1} de açúcares redutores totais, verificou-se 14,87 g L^{-1} de açúcares residuais no vinho.

Nos ciclos 8 e 9, devido à queda da viabilidade, ao longo do processo fermentativo, as fermentações foram interrompidas, o que levou ao aumento nas concentrações médias de açúcares residuais no vinho (132,22 g L^{-1} e 105,98 g L^{-1}, respectivamente), principalmente devido à frutose residual.

Apesar de tanto a glicose, quanto a frutose serem açúcares fermentescíveis, as leveduras têm preferência pela glicose (BERTHELS et al., 2004). Isso resulta em uma maior concentração de frutose na fase final da fermentação, momento em que as leveduras podem estar sob condições de estresse, devido ao teor alcoólico do vinho e a falta de nitrogênio no meio (Perez et al., 2005).

CERQUEIRA (2013), utilizando a levedura Pedra-2 para a fermentação de caldo de cana-de-açúcar concentrado a 30°Brix (suplementado com 24 mM de sulfato de amônia), observou que a concentração de açúcares residuais no vinho, após 24 horas de fermentação, era de aproximadamente 65 g L^{-1} e a viabilidade média das células de leveduras era de 75%. Esse resultado mostra que as concentrações de açúcares residuais verificadas para as leveduras C22 e Y904 podem estar relacionadas ao menor tempo de fermentação (17 horas para os mostos com 30°Brix) e também com a falta de suplementação do meio.

TRONCHONI et al. (2009), compararam 12 linhagens de leveduras para a fermentação de mostos de uva tinta, padronizados em 228 g L^{-1} de açúcares redutores (112 g L^{-1} de glicose e 116 g L^{-1} de frutose). A temperatura de fermentação foi de 28°C e a concentração de inóculo igual a 6 x 10^{10} UFC m L^{-1}. Nesses estudos foi verificado que a proporção entre o consumo de glicose e frutose, bem como o tempo de fermentação varia de linhagem para linhagem. Quanto ao tempo de fermentação, a linhagem híbrida de *S. cerevisiae* x *S. bayanus* S6U apresentou maior desempenho, levando cinco dias para consumir todo o açúcar disponível no meio. No primeiro dia foram consumidos apenas 20% do total de açúcares. Já a linhagem híbrida *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kugriavzevii* CBS2834, levou 8 dias para fermentar todo o açúcar disponível no meio. No entanto, consumiu aproximadamente 40% do total de açúcares no primeiro dia de fermentação.

Com base em discussões apresentadas por LEWIS et al. (2010), infere-se que as altas concentrações de etanol inibiram o transporte de hexoses pelas leveduras C22 e Y904, comprometendo o processo fermentativo. De acordo com LAOPAIBOON et al. (2009), a suplementação do mosto com nitrogênio e o maior tempo de fermentação podem aumentar a produção de etanol e consequentemente reduzir os açúcares residuais.

A maior concentração de açúcares residuais nos vinhos provenientes das fermentações com a linhagem Y904 pode estar relacionada com a queda da viabilidade celular ao longo do processo de adaptação. Isso indica que a linhagem Y904 não apresentou capacidade de adaptação satisfatória.

Apesar do melhor desempenho da linhagem C22, as fermentações realizadas com ambas as linhagens apresentaram altas concentrações de açúcares residuais, resultando em baixas concentrações de etanol no vinho.

5.2.4. Concentração de etanol no vinho

Analisando as concentrações de etanol nos vinhos verifica-se que não existiram interações entre os fatores "Levedura" e "concentração de açúcar no mosto" para a produção de etanol. Isto porque analisando cada um desses fatores individualmente, pode-se verificar que apenas as concentrações de açúcares dos mostos influenciaram, estatisticamente, nas concentrações de etanol dos vinhos.

Devido a interrupção da fermentação nos ciclos 8 e 9, a maior concentração de etanol no vinho foi observada no ciclo 7 (12,74% (v v^{-1}) (Figura 12).

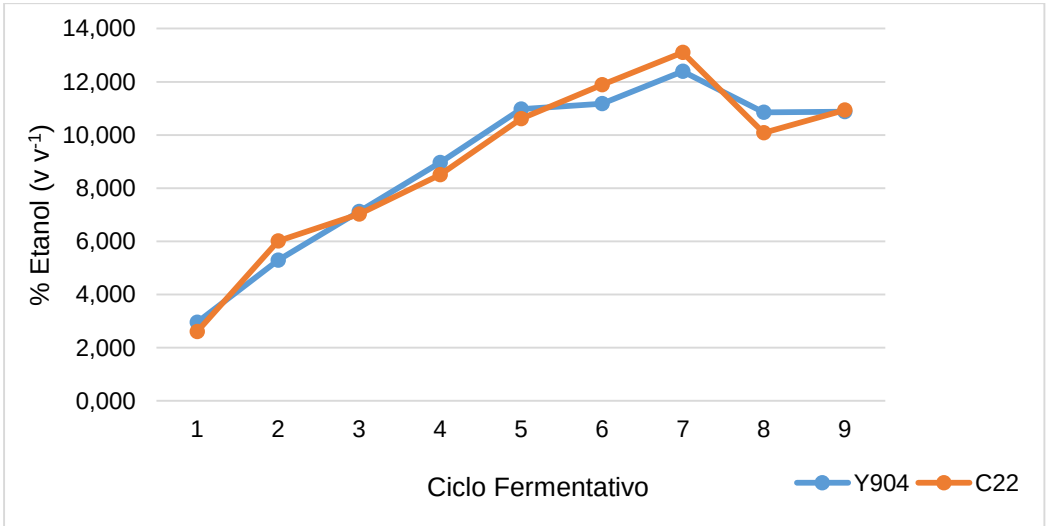

Figura 13. Concentrações de etanol nos vinhos ao longo dos ciclos fermentativos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Em todos esses ciclos fermentativos, os teores alcoólicos dos vinhos foram considerados baixos. Isto porque, por exemplo, no ciclo 7, a concentração de açúcares redutores totais disponíveis no mosto, teoricamente, poderia permitir a obtenção de vinho com aproximadamente 16% (v v^{-1}) de etanol.

Os resultados apresentados indicam que mesmo submetidas ao processo de adaptação, as leveduras apresentaram tolerância ao etanol limitada, sendo que esse limite variou entre as linhagens C22 (13,01% v v^{-1}) e Y904 (12,39% v v^{-1}). Estes resultados corroboram com as conclusões de PRATT et al. (2003). Segundo estes autores, a concentração de etanol necessária para a inibição do processo fermentativo está relacionada com a linhagem utilizada para a fermentação e também com as características do meio.

LAOPAIBOON et al. (2009), utilizaram a linhagem de levedura *S. cerevisiae* NP01 para a fermentação de mostos com 280; 320 e 340 g L^{-1} de ART, preparados a partir de caldo de sorgo sacarino, melaço, com e sem suplementação de peptona (5 g L^{-1}). Após acompanhar o processo fermentativo por 80 horas, verificaram que as concentrações de etanol foram iguais a 12,6% (v v^{-1}) para os três mostos. Por outro lado, realizando as mesmas fermentações (280; 320 e 340 g L^{-1} de ART), suplementando os mostos com 3 g L^{-1} de extrato de levedura, as concentrações de etanol aumentaram para 13,9% (v v^{-1}). Em ambos os casos as leveduras metabolizaram os açúcares até as 40 horas de fermentação, no entanto, mais de 80% dos açúcares foram metabolizados nas primeiras 24 horas. Considerando apenas o primeiro dia de fermentação, o comportamento das linhagens C22 e Y904 foi semelhante ao comportamento da linhagem NP01, no estudo realizado por LAOPAIBOON et al. (2009).

5.2.5. Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base nas concentrações de etanol no vinho final e nas contrações de açúcares redutores totais no mosto inicial. Neste sentido, assim como os consumos médios de açúcares, os rendimentos fermentativos médios obtidos também foram considerados baixos (≤ 85%) ao longo do processo de adaptação das leveduras (Tabela 9)

Tabela 9. Rendimentos fermentativos médios ao longo dos ciclos fermentativos para a adaptação das linhagens Y904 e C22.

Linhagem	Rendimento Fermentativo (%)								
	Ciclo Fermentativo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Y904	$84,08^{Aa}$	$66,07^{Bbc}$	$80,41^{Aa}$	$83,59^{Aa}$	$82,08^{Aa}$	$75,06^{Aab}$	$75,98^{Aab}$	$61,07^{Ac}$	$61,19^{Ac}$
C22	$74,16^{Ba}$	$75,14^{Aa}$	$79,37^{Aa}$	$79,32^{Aa}$	$79,43^{Aa}$	$79,81^{Aa}$	$80,32^{Aa}$	$56,72^{Ab}$	$61,50^{Ab}$

^{ABabc}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância

A análise dos dados demonstrou que o rendimento fermentativos médio (79,54%) não variou ao longo dos sete primeiros ciclos fermentativos, com exceção do ciclo fermentativo 2, no qual a fermentação realizada pela linhagem Y904 apresentou menor rendimento fermentativo do que a fermentação executada com a linhagem C22. Também foram observadas diferenças nos rendimentos das fermentações realizadas nos ciclos 8 e 9. Contudo, nesses

dois últimos ciclos, uma possível explicação pode ser a interrupção das fermentações para manter a viabilidade do inóculo.

Em trabalho conduzido por VITOR (2014), os rendimentos fermentativos obtidos em fermentações utilizando mostos com concentrações de ART variando de 95 a 232 g L^{-1}, ficaram entre 64 a 84,5%. Valores semelhantes àqueles reportados por LAOPAIBOON et al. (2009).

Os baixos valores de rendimentos fermentativos observados nos primeiros ciclos de adaptação podem estar relacionados com a grande produção de biomassa nesses ciclos. No ciclo 2, a linhagem Y904 aumentou amassa de biomassa de 8,69% (v v^{-1}) para 11,37% (v v^{-1}). Isso corresponde ao aumento de 31%. De acordo com DE OLIVEIRA MENDES et al. (2013), são necessárias 8 g de glicose para a produção de 1 g (massa seca) de levedura, em condições anaeróbicas.

O rendimento fermentativo das fermentações realizadas por PEREIRA et al. (2011), utilizando mostos com concentrações de glicose oscilando entre 343 e 400 g por litro de mosto, foram todos superiores a 88%. Uma possível explicação para isso foi a composição do mosto utilizado por PEREIRA et al (2011). Segundo DE LA TORRE-GONZÁLEZ et al. (2016), a tolerância das leveduras ao etanol é menor em meios contendo frutose. Neste sentido, as concentrações de frutose residuais presentes nos vinhos provenientes das fermentações realizadas neste trabalho, podem ter inibido a produção de etanol, levando aos baixos índices de rendimento fermentativo.

5.2.6. Tempo de fermentação e produtividade em etanol

Os resultados apresentados na Tabela 10, demonstraram que com o aumento das concentrações de açúcares dos mostos, ocorreram aumentos dos tempos das fermentações. Nos ciclos 8 e 9, o tempo de fermentação foi inferior ao ciclo 7 porque as fermentações foram interrompidas, com o intuito de conservar a viabilidade celular das leveduras para ser reutilizada em outras etapas do projeto.

A interrupção do processo fermentativo nos ciclos 8 e 9 afetou negativamente o esgotamento dos açúcares dos mostos. No entanto, a produtividade da linhagem Y904 foi maior nos ciclos 8 e 9 do que nos ciclos 6 e 7 (Tabela 10). Isso porque possivelmente as avaliações foram feitas durante o período de maior crescimento celular e produção de etanol.

Tabela 10. Produtividade de etanol e tempo de fermentação, por ciclo e levedura.

Parâmetro	Linhagem	Ciclo Fermentativo								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Produt. (mL L^{-1} h^{-1})	Y904	$5,90^{Abc}$	$3,53^{Ad}$	$3,90^{Ad}$	$7,02^{Aa}$	$6,86^{Aa}$	$5,73^{Abc}$	$5,39^{Ac}$	$6,38^{Aa}$	$6,40^{Aa}$
	C22	$5,20^{Bc}$	$4,01^{Ad}$	$3,85^{Ad}$	$6,67^{Aa}$	$6,63^{Aa}$	$6,09^{Aab}$	$5,70^{Abc}$	$5,93^{Aabc}$	$6,43^{Aab}$
Tempo (h)	Y904	5,00	15,00	18,25	12,75	16,00	19,50	23,00	17,00	17,00
	C22	5,00	15,00	18,25	12,75	16,00	19,50	23,00	17,00	17,00

^{ABabc}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna (para o mesmo parâmetro) diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

NABAIS et al. (1988) utilizaram a linhagem industrial *S. cerevisiae* IST 154 (usada na produção de vinhos espumantes), para a fermentação de mosto com 320 g L^{-1} de glicose, com suplementação de 0,75 mM cloreto de cálcio. Nas fermentações realizadas com 10^5 células viáveis por mL, a concentração média de açúcares residuais foi de aproximadamente 85 g L^{-1}, o teor alcoólico do vinho igual a 12% (v v^{-1}) e o tempo de fermentação foi de 132 horas. Logo, a produtividade do processo fermentativo foi de 0,91 mL L^{-1} h^{-1}. Aumentando a concentração do inóculo para 5 x 10^6 células por mL, a concentração de açúcares residuais média reduziu para 20 g L^{-1}, o tempo de fermentação para 70 horas e o teor alcoólico médio do vinho aumentou para 14% (v v^{-1}). Neste caso, a produtividade aumentou para 2 mL L^{-1} h^{-1}. Analisando o processo fermentativo até as primeiras 24 horas, a produtividade foi maior que 3 mL L^{-1} h^{-1}. Isso mostra como o prolongamento do tempo de fermentação prejudica a produtividade do processo fermentativo.

No trabalho de LAOPAIBOON et al. (2009), nas fermentações com 320 g L^{-1} de ART, o tempo de fermentação foi de 70 horas e o teor alcoólico do vinho igual a 13,9% (v v^{-1}). Logo, a produtividade de etanol do processo foi de aproximadamente 2 mL L^{-1} h^{-1}. No entanto, nas primeiras 24 horas de fermentação, o teor alcoólico do vinho foi de 12,7% (v v^{-1}). Isto significa que mais de 90% do etanol foi produzido no primeiro dia de fermentação. Neste sentido, a produtividade do primeiro dia foi de 5,29 mL L^{-1} h^{-1}. Este valor é semelhante ao valor médio observado para as linhagens C22 e Y904 (5,6 mL L^{-1} h^{-1}).

VITOR (2014), observou a produtividade média de 8,1 g de etanol por litro de mosto por hora, o que corresponde a 10,26 mL L^{-1} h^{-1}, valor próximo ao praticado nas usinas. Em estudos conduzidos por Li et al. (2009) foram encontrados resultados semelhantes ao do trabalho de VITOR.

Baixos valores de rendimento fermentativo e de produtividade podem estar associados às altas concentrações alcoólicas no vinho, mas também por outros fatores como o pH do mosto, a temperatura de fermentação e a presença de contaminantes (CAMOLEZ & MUTTON 2005). Segundo GUTIERREZ (1991) os fatores de estresse da fermentação afetam diretamente na concentração de glicerol do vinho.

5.2.7. Glicerol

A interação dos fatores leveduras e concentração de açúcar (ciclos fermentativos), ao longo do processo de adaptação, não foi significativa. No entanto, analisando os fatores individualmente, ambos foram significativos. A levedura C22 produziu, em média, 10,04 g L^{-1} de glicerol e a levedura Y904, produziu em média, 9,47 g L^{-1}, ou seja, a linhagem C22 produziu concentração de glicerol 6% maior que a linhagem Y904. Em relação aos ciclos, a concentração de glicerol aumentou até o ciclo 9 (com exceção do ciclo 8), como pode ser observado na Figura 13.

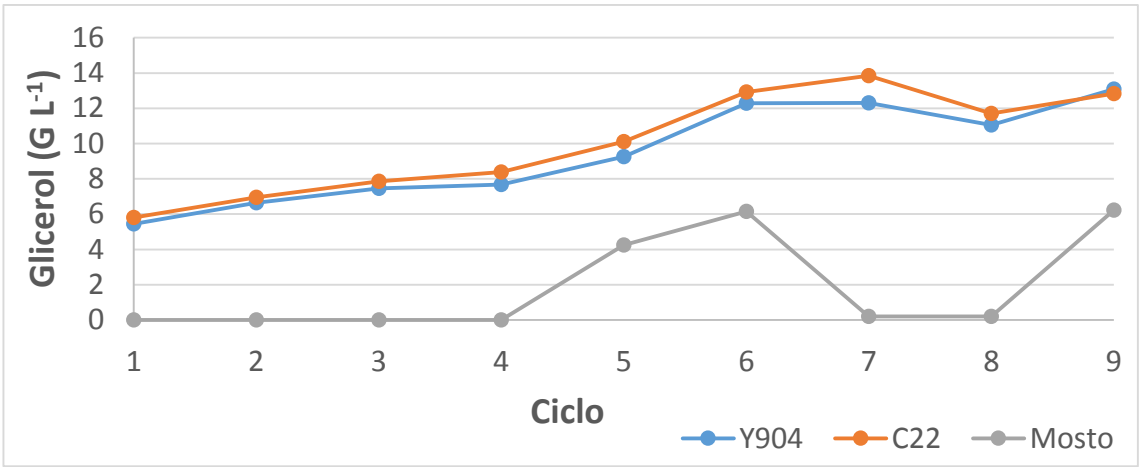

Figura 14. Concentração de glicerol do vinho e do mosto ao longo dos ciclos fermentativos.

Os resultados mostraram que as maiores concentrações de açúcares podem levar a maior produção de glicerol. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por D'AMORE et al. (1987) e BASSO et al. (2011).

Segundo GUTIERREZ (1991), o aumento da concentração de açúcares pode levar ao aumento da atividade de enzimas glicolíticas, bem como a redução na atividade da enzima álcool desidrogenase. Reduzindo-se a atividade da álcool desidrogenase, a regeneração do NAD deve ocorrer pela glicerol-3-fosfato desidrogenase. Esse comportamento pode indicar uma situação de estresse celular. Principalmente, porque em condições de estresse osmótico as leveduras tendem a aumentar a concentração intracelular de glicerol, como forma de contornar a perda de água para o meio.

Além da concentração de açúcares, a linhagem utilizada também pode influenciar na produção de glicerol, assim como observado por GUTIERREZ (1991), comparando as linhagens M-300-A e IZ-1904 com a levedura utilizada para a panificação.

Utilizando levedura de panificação para a fermentação de mostos com 8; 11; 14 e 16% de sacarose, GUTIERREZ (1991) verificou a produção de 3,1; 3,5; 4,1 e 6,2 g L^{-1} de glicerol, respectivamente. No presente estudo, nos ciclos 2 e 3, as concentrações de açúcares foram próximas a 11 e 14%. No entanto, as concentrações de glicerol encontradas neste estudo foram 6,80 e 7,65 g L^{-1}. Essas concentrações equivalem praticamente ao dobro dos valores descritos por GUTIERREZ (1991).

De acordo com JACKMAN (1987), a concentração de glicerol produzida pelas leveduras ao longo do processo fermentativo pode variar de 2 a 5% da concentração de açúcares redutores totais do mosto. A produção de glicerol encontrada nos ciclos 4; 5; 8 e 9, foram 8,03; 9,69; 11,38 e 12,97 g L^{-1}, respectivamente. Esses valores estão de acordo com o trabalho de Jackman. Contudo, nos outros ciclos de fermentação (1; 2; 3; 6 e 7), as concentrações de glicerol foram superiores a 5% da quantidade de ART. A maior produção de glicerol mencionada pode estar relacionada com vários fatores, tais como: a temperatura de fermentação, o pH do mosto e a presença de contaminantes. Além disso, corroborando parcialmente com Jackman (1987), as quantidades de glicerol produzidas podem variar como a linhagem e utilizar mais de 5% dos carboidratos para a produção de glicerol.

Segundo THOMAS et al. (1996), a presença de bactérias láticas no processo fermentativo pode reduzir a produção de etanol e aumentar o direcionamento de carboidratos para a produção de glicerol. O aumento da produção de glicerol exercida pelas bactérias láticas está relacionado com metabólitos excretados por estas bactérias. De acordo com BASSO (2006), o ácido lático é o principal metabólito excretado pelas bactérias láticas, em seguida, o manitol.

5.2.8. Ácido lático e manitol

Apesar do uso de mostos esterilizados, os experimentos não foram conduzidos em condições assépticas. Isso levou a presença de microrganismos contaminantes, verificada pelas diferentes concentrações dos ácidos orgânicos ao término das fermentações.

A concentração de ácido lático nas fermentações realizadas pelas duas linhagens de leveduras, aumentou de 0,39 g L^{-1} para 1,37 g L^{-1}, do ciclo fermentativo 1 ao 8. Porém, no ciclo 9, diminuiu para 1,08 g L^{-1}. A partir do ciclo 4, até ciclo 7, as concentrações de ácido lático nas fermentações realizadas com a linhagem C22 (0,86 g L^{-1}), foram maiores do que as concentrações desse ácido verificadas nas fermentações realizadas com a linhagem Y904 (Tabela11).

Tabela 11. Concentração de ácido lático presente no vinho delevedurado, ao longo dos ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Parâmetro	Linhagem	Ciclo Fermentativo								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ác. Lático (g L^{-1})	Y904	$0,15^{Af}$	$0,13^{Af}$	$0,39^{Ae}$	$0,55^{Bd}$	$0,68^{Bd}$	$0,63^{Bd}$	$0,85^{Bc}$	$1,35^{Aa}$	$1,08^{Ab}$
	C22	$0,13^{Ag}$	$0,16^{Ag}$	$0,48^{Af}$	$0,71^{Ae}$	$0,83^{Ade}$	$0,91^{Acd}$	$0,98^{Abc}$	$1,39^{Aa}$	$1,09^{Ab}$
Manitol (g L^{-1})	Y904	$0,66^{Ae}$	$1,19^{Ade}$	$1,66^{Ad}$	$1,78^{Ad}$	$2,27^{Ac}$	$3,09^{Aa}$	$3,08^{Aab}$	$3,61^{Aab}$	$2,55^{Abc}$
	C22	$0,64^{Af}$	$1,17^{Aef}$	$1,62^{Ade}$	$1,65^{Acd}$	$2,24^{Ac}$	$2,89^{Ab}$	$2,97^{Aab}$	$3,04^{Ba}$	$2,31^{Ac}$

^{ABabcdefg}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna (para o mesmo parâmetro) diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

De acordo com NGANG et al. (1989), quanto maior a pressão osmótica do meio, menor a concentração de ácido lático necessária para inibir a produção de etanol. Utilizando mostos com 70 g L^{-1}de sacarose e concentrações de ácido lático na faixa de 0 à 10 g L^{-1}, a taxa específica de produção de etanol foi maior nos ensaios com 10 g L^{-1} de ácido lático. Para mostos com 140 g L^{-1} de sacarose, a inibição ocorreu a partir de 2,5 g L^{-1} de ácido lático. No entanto, os resultados obtidos indicam que a concentração de ácido lático não foi o principal fator de inibição do processo fermentativo. Esta hipótese pode ser confirmada com base nos resultados dos ciclos 8 e 9. Apesar da concentração de ácido lático ter sido maior no ciclo 8, a concentração de etanol no vinho, a produtividade e o rendimento fermentativo foram iguais nos dois ciclos.

Quanto ao manitol, os resultados obtidos nas fermentações não diferiram estatisticamente entre as linhagens C22 e Y904 para as concentrações produzidas. A concentração de manitol aumentou de 0,65 para 2,26 g L^{-1} do ciclo 1 até o ciclo 5. Depois manteve-se em concentração constante (3,01 g L^{-1}) até o ciclo 8 e reduziu para 2,43 g L^{-1} no último ciclo fermentativo.

As análises cromatográficas dos mostos demonstraram que as concentrações de manitol foram próximas dos valores verificados nos vinhos. Isso indica que a contaminação não decorreu do processo fermentativo, mas sim na matéria-prima utilizada para o preparo do mosto (Figura 14).

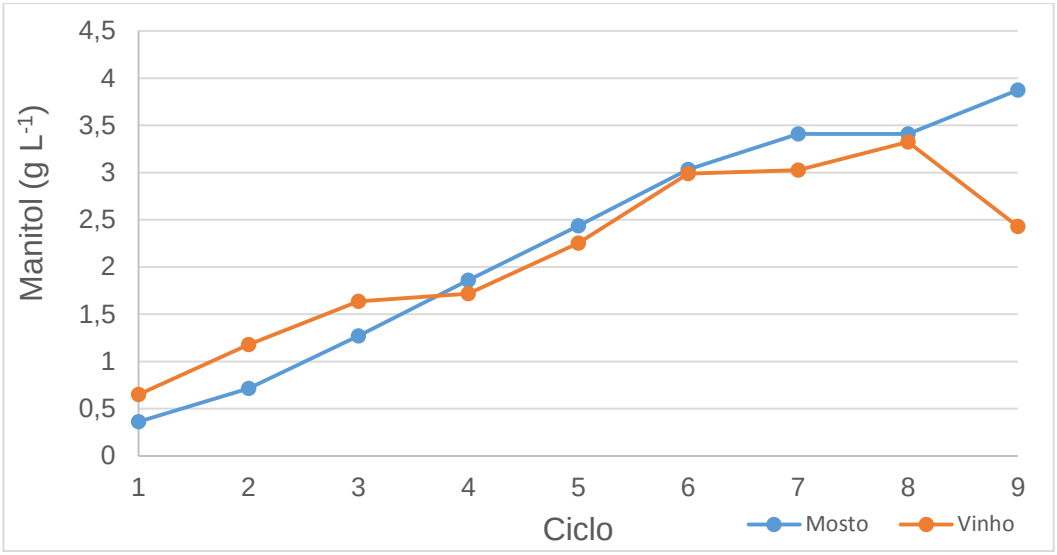

Figura 15. Concentração de manitol do vinho e do mosto ao longo dos ciclos fermentativos.

De acordo com BASSO (2006), a concentração de ácido lático presente nas fermentações é maior que a concentração de manitol. No entanto, neste estudos, nas fermentações com as linhagens de levedura C22 e Y904, a concentração média de manitol (2,13 g L^{-1}) foi maior do que a concentração de lactato (0,72 g L^{-1}).

Nas fermentações realizadas por GOMES (2009), vinhos com 108 células de bactérias por mL apresentaram em torno de 0,12 g L^{-1} de manitol e 3,83 g L^{-1} de lactato. No ciclo 1, a concentração média de manitol das amostras fermentadas pelas linhagens C22 e Y904 foi aproximadamente seis vezes maior do que o valor observado por GOMES (2009). No ciclo 9, a concentração de manitol foi 20 vezes maior do que os resultados observados por Gomes e colaboradores. No entanto, com base nos valores de rendimento fermentativo e produtividade disponíveis na literatura, as concentrações de ácido lático e manitol não apresentaram grande impacto no processo fermentativo. O que pode indicar as leveduras apresentam habilidade de adaptação não apenas às altas concentrações de etanol do vinho, mas também aos metabólitos sintetizados por micro-organismos contaminantes.

5.2.9. Ácidos acético, succínico, fórmico

As concentrações de ácido acético nos vinhos delevedurados aumentaram do ciclo 1 ao o ciclo 9. A maior formação de ácido acético foi observada nas fermentações realizadas com a linhagem C22. Com a utilização dessa linhagem de levedura, foram encontrados 1,91; 2,91; 3,17; 3,0 e 3,23 g L^{-1} de ácido acético, nos ciclos 3; 4; 5; 6 e 7, respectivamente (Tabela12).

Tabela 12. Concentrações dos ácidos acético, succínico e aconítico presentes no vinho delevedurado, ao longo dos ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Ácido		Ciclo Fermentativo								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acético (g L^{-1})	Y904	$0,28^{Af}$	$0,57^{Af}$	$1,27^{Be}$	$1,75^{Bd}$	$2,32^{Bc}$	$2,04^{Bcd}$	$2,85^{Bb}$	$3,40^{Aa}$	$3,67^{Aa}$
	C22	$0,40^{Ae}$	$0,57^{Ae}$	$1,91^{Ad}$	$2,91^{Ac}$	$3,17^{Aabc}$	$3,00^{Abc}$	$3,23^{Aabc}$	$3,44^{Aab}$	$3,52^{Aa}$
Succínico (g L^{-1})	Y904	$0,73^{Ac}$	$0,76^{Abc}$	$1,42^{Aa}$	$1,33^{Aab}$	$1,26^{Aabc}$	$1,62^{Aa}$	$1,04^{Babc}$	$0,71^{Ac}$	$1,12^{Aabc}$
	C22	$0,56^{Ade}$	$0,41^{Ae}$	$1,27^{Abc}$	$1,22^{Ac}$	$1,11^{Acd}$	$1,85^{Aab}$	$2,02^{Aa}$	$0,97^{Acde}$	$1,08^{Acd}$
Fórmico (g L^{-1})	Y904	$0,00^{Ad}$	$0,03^{Ad}$	$0,09^{Bcd}$	$0,14^{Aab}$	$0,19^{Aab}$	$0,15^{Abc}$	$0,14^{Abc}$	$0,23^{Aa}$	$0,18^{Aab}$
	C22	$0,01^{Ab}$	$0,01^{Ab}$	$0,15^{Aa}$	$0,15^{Aa}$	$0,15^{Aa}$	$0,15^{Aa}$	$0,10^{Aa}$	$0,17^{Ba}$	$0,17^{Aa}$

^{ABabcdef}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem (para o mesmo ácido) entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

De acordo com ZOECKLEIN et al. (1999) em fermentações conduzidas com mostos contendo 28°Brix, a acidez volátil de vinhos pode chegar à concentração de 1,7 g L^{-1} de, expressa em ácido acético. Esse valor corresponde à metade do valor verificado no presente trabalho.

PALMQVIST et al. (2000), verificou que em meios com 25 g L^{-1} de glicose a levedura é capaz de tolerar até 10 g L^{-1} de ácido acético sem ter sua produção de biomassa, consumo de glicose e produtividade afetados. No entanto, o efeito tóxico do ácido acético é acentuado com o aumento do teor alcoólico e apresenta sinergismo com o ácido lático, tornando-se mais tóxico, conforme o aumento da concentração de ácido lático.

Segundo EGLINTON et al. (2002), o aumento da atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase pode levar ao aumento da produção de ácido acético pelas leveduras. Neste sentido, as altas concentrações de glicerol produzidas pelas linhagens C22 e Y904 podem ter levado ao aumento da produção de ácido acético. No entanto, uma vez constatada a presença de metabólitos produzidos por bactérias no mosto e no vinho, as concentrações de ácido acético observadas devem estar mais relacionadas com a contaminação. Isso porque a presença de bactérias no mosto pode levar ao aumento da produção de ácido acético, chegando a concentrações entre 5 e 6 g L^{-1} e podendo reduzir o rendimento fermentativo em até 60% (AMORIN & OLIVEIRA 1982).

Como resposta a contaminação do mosto, as leveduras tendem a aumentar a produção de ácido succínico, o qual atua como agente antibacteriano natural (BASSO et al., 1997). As concentrações de ácido succínico produzidas ao longo dos ciclos fermentativos das linhagens C22 e Y904, variaram de 0,59 g L^{-1} (ciclo 2) a 1,74 g L^{-1} (ciclo 7), em média. No entanto, as maiores concentrações de ácido succínico não foram nos ciclos com maiores concentrações dos ácidos lático, acético e manitol.

De acordo com THOUKIS et al. (1965), a produção de ácido succínico não é afetada pela linhagem de levedura utilizada no processo de fermentação. Ao longo do processo de adaptação das leveduras, o ciclo 7 foi o único em que a concentração de ácido succínico produzido pelas linhagens C22 e Y904 foi estatisticamente diferente ($p \leq 0.05$).

De acordo com GOMES (2009), em fermentações alcoólicas com 10% de ART a concentração de ácido succínico variou de 0,24 g L^{-1} a 0,48 g L^{-1}. Segundo WHITING (1976), a concentração de ácido succínico pode variar

de 36 mg L^{-1} até concentrações superiores a 1,8 g L^{-1}, de acordo com a concentração do mosto utilizado no processo de fermentação. Os resultados do presente trabalho corroboram com aqueles obtidos por GOMES (2009) e WHITING (1976).

Quanto ao ácido fórmico, esta concentração manteve-se estável nos dois primeiros ciclos da fermentação realizada pela linhagem C22. Quando as fermentações foram realizadas pela levedura Y904, os teores de ácido fórmico mantiveram-se constantes até o terceiro ciclo de fermentação, com um valor médio de (0,04 g L^{-1}). Nos demais ciclos, a concentração de ácido fórmico foi constante (0,16 g L^{-1}) para ambas linhagens.

Segundo GUTIERREZ (1989), concentrações até 1g L^{-1} de ácido fórmico não comprometem a produção de etanol, nem a qualidade do álcool produzido. Logo, os valores de ácido fórmico observados podem ser considerados baixos. O que já era esperado pois o ácido fórmico é um composto encontrado principalmente no melaço e é formado pela degradação dos açúcares redutores do caldo de cana-de-açúcar, no processo de produção de açúcar (GUTIERREZ 1989). A formação do ácido fórmico está mais relacionada com o processo de cozimento. Como o xarope passa apenas pelo processo de evaporação, sua concentração de ácido fórmico tende a ser menor.

O aumento da concentração média de ácido fórmico, ao longo dos ciclos de adaptação, de 0,04 g L^{-1} para 0,16 g L^{-1} está relacionado com o volume de xarope utilizado para o preparo do mosto.

Segundo MOAT et al. (2002), algumas bactérias homofermentativas são capazes de sintetizar o ácido fórmico, a partir do ácido acético. Essa poderia ser uma explicação para as diferenças observadas entre as linhagens C22 e Y904 nos ciclos 3 e 8. Principalmente, se compararmos com os valores de ácido acético produzidos no ciclo 3. Ambos os valores foram superiores para a linhagem C22.

5.2.10. Ácido aconítico

A produção de ácido aconítico não sofreu influência da interação dos fatores "Levedura" e "concentração de açúcar no mosto". No entanto, tanto a linhagem de leveduras, quanto as concentrações de açúcares nos mostos, apresentaram influência na produção de ácido aconítico. Os vinhos fermentados com a levedura C22 apresentaram, em média, concentrações de ácido aconítico 7,5% maiores do que os vinhos fermentados com a levedura Y904.

Assim como a concentração de açúcares do mosto, a concentração de ácido aconítico aumentou do primeiro até o oitavo ciclo fermentativo. No entanto, a concentração desse ácido sofreu redução no ciclo 9 (Figura 15).

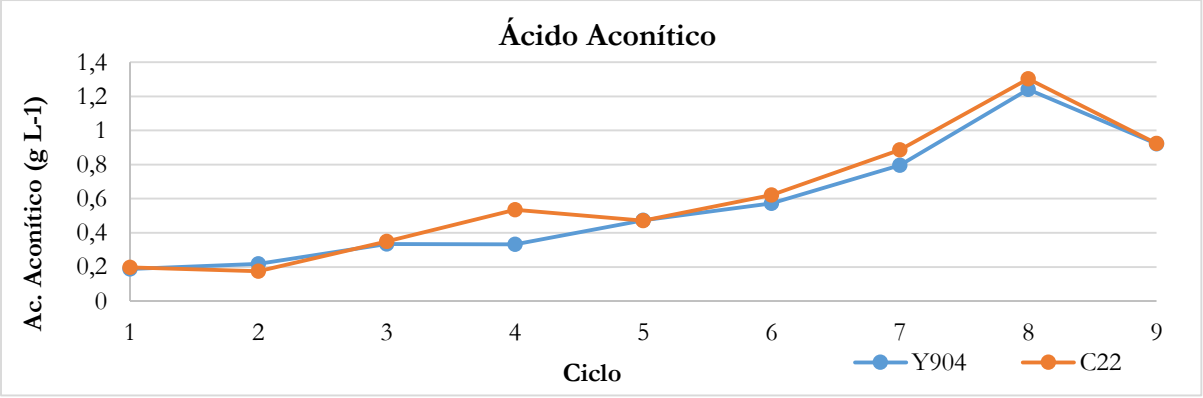

Figura 16. Concentração de ácido aconítico presente no vinho delevedurado, ao longo dos ciclos de adaptação das linhagens Y904 e C22.

Segundo GUTIERREZ (1989), o ácido aconítico é o principal ácido produzido pela cana-de-açúcar e sua concentração no caldo está em torno de 948,2 mg L^{-1}. Como base nesse valor, a concentração de ácido aconítico quantificada nos vinhos está de acordo com a literatura e o aumento de sua concentração ao longo dos ciclos era esperado, uma vez que a concentração de xarope no mosto foi crescente.

O decréscimo na concentração de ácido aconítico verificado no ciclo 9 não era esperado, uma vez que a composição do mosto utilizado nos ciclos 8 e 9 foi a mesma. A mesma observação pode ser feita para as diferenças observadas entre as leveduras.

De acordo com STRASSMAN & CECI (1966), o ácido aconítico pode ser utilizado pelas leveduras para a síntese do aminoácido lisina. Logo, a menor concentração de ácido aconítico no vinho do ciclo 9, pode indicar uma carência nutricional ao término da fermentação.

5.2.11. Microscopia eletrônica de varredura

Analisando as imagens das leveduras da linhagens C22 e Y904 obtidas através do microscópio eletrônico de varredura, com aumento de 25.000 vezes, pode-se verificar que as linhagens apresentaram diferenças morfológicas significativas na parede celular, ao longo do processo de adaptação das células aos mostos com teores alcoólicos mais elevados (Figura 16).

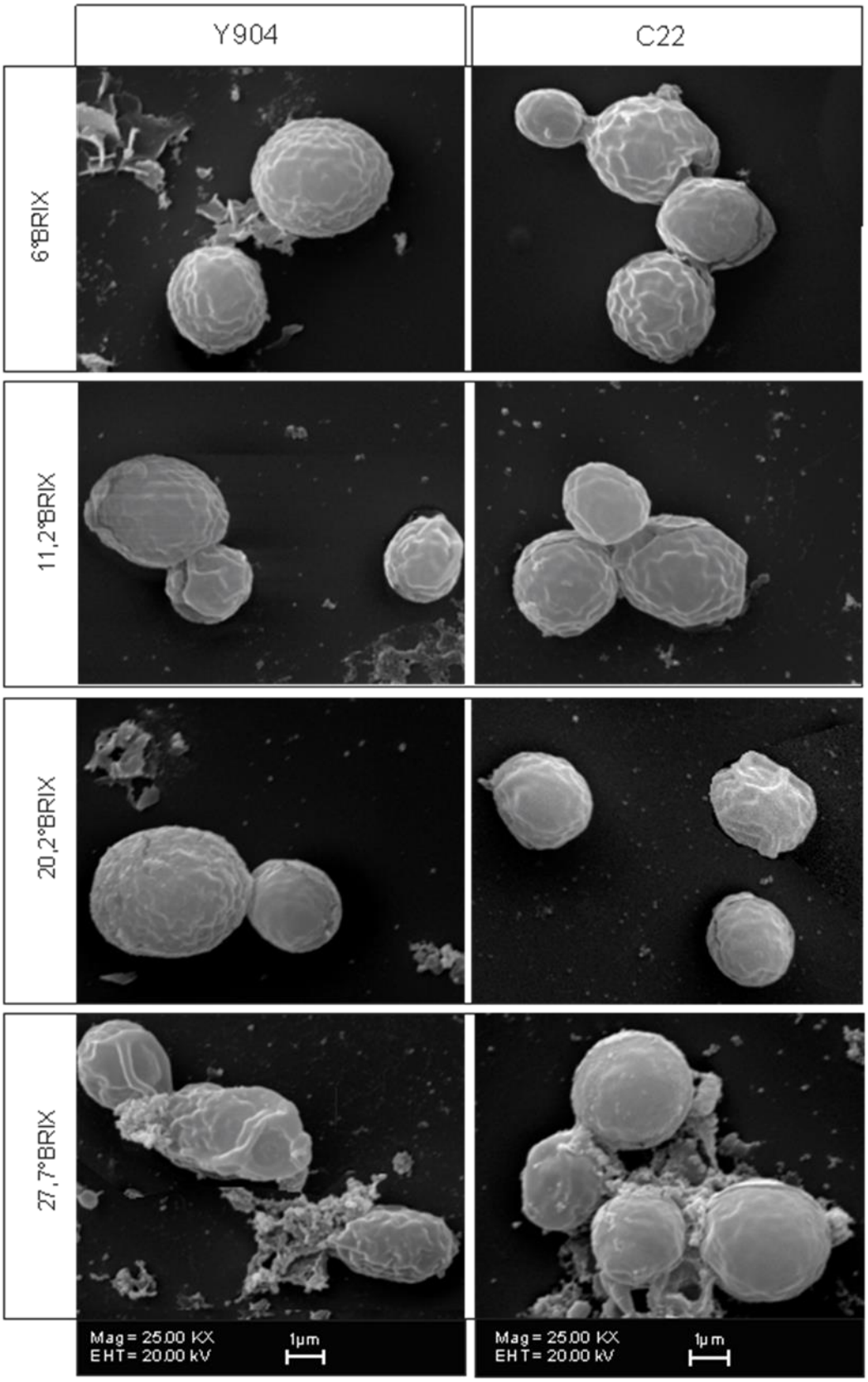

Figura 17. Imagens das leveduras ao longo do processo de adaptação, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

No primeiro ciclo, as duas linhagens de leveduras apresentaram formato arredondado, porém rugoso, indicando um possível estresse. Isto que pode ser confirmado, com a baixa viabilidade celular inicial (76% para a linhagem Y904 e 83% para a linhagem C22). (Tabela 6, pg 48).

No decorrer dos ciclos fermentativos, a linhagem C22 demonstrou ter maior capacidade de se adaptar às condições do meio, uma vez que as células dessa linhagem foram se tornando mais turgidas, à medida que foram ocorrendo os ciclos fermentativos. Isso pode ser observado até o último ciclo fermentativo. Já as células de leveduras da linhagem Y904, o intumescimento das células se deu até o ciclo 5. Isto também coincide com o ciclo fermentativo, no qual as células de leveduras dessa linhagem sofrem grande perda de viabilidade celular. De modo que, no último ciclo fermentativo, todas as células visualizadas estavam alongadas e com aspecto mumificado (Figura13). Isto também coincide com o ciclo onde as células de leveduras apresentaram baixa viabilidade celular (33,85 % - Tabela 6, pg 48).

VITOR (2014), utilizando a levedura da linhagem Pedra 2 para a fermentação de mostos com teores de sólidos solúveis de 9 a 24°Brix, verificou que as células das leveduras não apresentaram alterações morfológicas visíveis ao longo do processo de adaptação. Comparando as imagens obtidas por VITOR (Figura 17), com as imagens da Figura 16, pode-se observar que as células de leveduras da linhagem Pedra 2 apresentaram aspecto pouco rugoso, desde o primeiro ciclo fermentativo, diferentemente do que foi observado nas linhagens C22 e Y904. Essa diferença pode estar relacionada com o armazenamento das leveduras antes do uso ou com o preparo das leveduras para a análise microscópica.

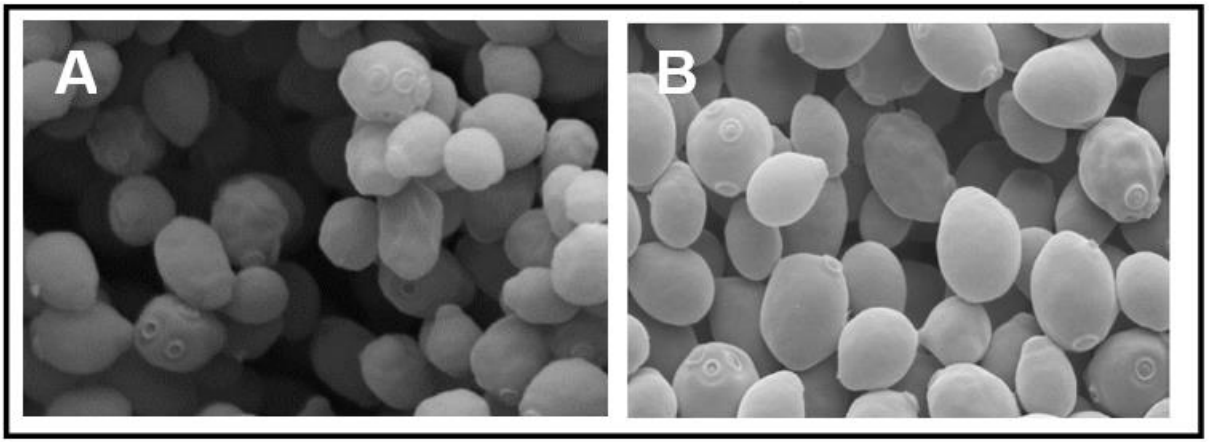

Figura 18. Imagens da levedura Pedra 2 ao longo do processo de adaptação por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com aumento de 5000X. A: 9°Brix, B:24°Brix.

5.3. Fermentação com alto teor alcoólico

5.3.1. Viabilidade celular

A análise das células de leveduras ao término da fermentação mostrou que a adaptação da linhagem Y904 não foi eficiente, uma vez que as viabilidades das leveduras adaptadas e não adaptadas foram semelhantes. A viabilidade da linhagem Y904 foi inferior a 75%. Isso pode ser um desafio a ser superado se pensarmos no uso dessa linhagem para a condução de fermentações utilizando mostos com concentração de açúcares iguais ou maiores às concentrações utilizadas neste experimento. Apesar dos valores de viabilidade final da linhagem Y904 adaptada e não adaptada terem sido semelhantes, a viabilidade inicial da linhagem Y904 adaptada, foi menor do que a 35%. Logo, apesar da inaptidão da linhagem Y904 adaptada para a condução de fermentações nas condições avaliadas, o processo de adaptação aumentou seu desempenho. Isso porque ao invés de a viabilidade celular da Y904 adaptada diminuir ao longo do ciclo fermentativo, ela aumentou.

Em relação a linhagem C22, o processo de adaptação foi fundamental para manter a viabilidade celular. Comparando a viabilidade da linhagem C22 adaptada e não adaptada, pode-se verificar que o processo de adaptação aumentou em mais de 20% a viabilidade desta levedura em relação às população controle não adaptada (Tabela16). A diferença do comportamento das linhagem C22, indica que a levedura Y904 pode ter atingido limite genético de adaptação, nas condições estudadas.

Tabela 13. Viabilidade celular (%) das leveduras ao término da fermentação.

Viabilidade	Linhagem	Adaptada	Não Adaptada
Inicial	Y904	$33,90^{Bb}$	$76,70^{Ba}$
	C22	$76,00^{Ab}$	$83,20^{Aa}$
Final	Y904	$56,69^{Ba}$	$55,12^{Ba}$
	C22	$83,59^{Aa}$	$68,76^{Ab}$

^{ABab}Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por VITOR (2014), bem como com os dados apresentados na etapa de adaptação (Item 5.2.1, pg. 47).

PEREIRA et al. (2012) avaliaram o uso da levedura da linhagem Pedra 2 para fermentações com alto teor alcoólico, em 15 ciclos fermentativos com concentrações de 343 até 400 g de glicose por litro de mosto. A viabilidade da linhagem Pedra 2 não foi constante ao longo dos ciclos e chegou a 27%. Este valor é aproximadamente 50% inferior a viabilidade verificada para a linhagem Y904 e de 70% menor do que da linhagem C22. Esses resultados demonstraram a importância da escolha da linhagem, bem como do processo de adaptação.

De acordo com PRATT et al. (2003) e BENEY et al. (2001), o aumento da pressão osmótica pode reduzir a viabilidade das leveduras. No entanto, os efeitos do estresse osmótico variam de acordo com a linhagem de levedura utilizada. Esses mesmos autores ainda verificaram que, as linhagens utilizadas para a fermentação de cervejas tipo ale foram mais tolerantes ao estresse osmótico do que as linhagens utilizadas para a fermentação de cervejas tipo lager.

5.3.2. Glicerol

A concentração média de glicerol nos vinhos fermentados pela linhagem Y904 foi igual a 19,36 g L^{-1}. Este valor foi cerca de 10 % maior do que o valor médio encontrado nos vinhos provenientes das fermentações conduzidas com a linhagem de levedura C22 (17,86 g L^{-1}).

Em relação a adaptação das leveduras, as análises demonstraram que a concentração de glicerol foi maior para as linhagens não adaptadas. A concentração média de glicerol das linhagens não adaptadas foi igual a 19,15 g L^{-1}, enquanto nas linhagens adaptadas o teor de glicerol médio foi de 18,07 g L^{-1}.

De acordo com OURA (1977) para cada g de glicose no mosto são produzidos de 0,03 a 0,05 g de glicerol. No mesmo sentindo, GUTIERREZ (1991) verificou que nos processos de fermentação tradicionais, utilizando mostos com 16% de açúcares, a concentração média de glicerol foi de aproximadamente de 6,2 g L^{-1}.

CAMOLEZ & MUTTON (2005), analisaram o vinho delevedurado produzido em uma usina ao longo da safra e verificaram que a concentração de média foi igual a 383,15 mg L^{-1} e a presença de contaminações elevou esse valor para 420 mg L^{-1} de glicerol.

Por outro lado, BRUMM & HEBEDA (1988) verificaram que o glicerol formado no processo de fermentação corresponde de 8 a 15 g por 100 g de etanol.

Os resultados de teores de glicerol obtidos no presente estudo não estão de acordo com os valores apresentados por OURA (1977) e CAMOLEZ & MUTTON (2005). Contudo, corroboram com os teores de glicerol reportados por BRUMM & HEBEDA (1988).

De acordo com NEVOIGT & STAHL (1997) a exposição das células de leveduras aos meios hipertônicos leva à perda de água do interior da célula para o meio de cultivo. Em resposta, as leveduras aumentam a concentração interna de certos solutos com o intuito de manter o volume, turgor, pressão e as atividades biológicas das células normais. Dentre os solutos citados, o glicerol é o mais importante para a osmorregulação de muitas leveduras, principalmente da *Saccharomyces cerevisiae*.

Apesar da concentração de glicerol no vinho estar diretamente relacionada a pressão osmótica do mosto, diversos estudos demonstram que os níveis de contaminação bacteriana podem influenciar na produção de glicerol. Isto talvez possa ser um indício da grande produção de glicerol verificada nas fermentações realizadas na presente investigação. Uma vez que a análise do mosto verificou a presença de altas concentrações de manitol (um dos principais metabólitos produzidos pelas bactérias láticas), não é possível afirmar que os altos valores de glicerol quantificados foram ocasionados apenas pela fermentação com alto teor alcoólico.

A menor concentração de glicerol foi observada nos vinhos provenientes de fermentações realizadas pelas leveduras da linhagem C22 adaptadas. Isto permite afirmar que tanto a escolha da linhagem, quanto o processo de adaptação foram significativos para o processo de fermentação com alto teor alcoólico.

5.3.3. Açúcares Residuais no vinho

As fermentações realizadas pelas leveduras dalinhagemC22 adaptadas apresentaram as menores concentrações de glicose residuais (2,07 g L^{-1}). Nas fermentações realizadas pelas leveduras da linhagem Y904 adaptada, a concentração de açúcares residuais (11,83 g L^{-1}) foi maior do as fermentações realizadas com a linhagem Y904 não adaptada (4,36 g L^{-1}) (Tabela14). No entanto, somando a concentração de frutose e de glicose, pode-se observar que a

concentração de açúcares residuais da linhagem Y904 (68,85 g L^{-1}) adaptada foi 28% menor do que na linhagem Y904 não adaptada (95,55g L^{-1}).

Tabela 14. Concentrações de glicose e frutose residuais, gramas por litro, no vinho delevedurado.

Açúcar	Linhagem	Adaptada (g L^{-1})	Não Adaptada (g L^{-1})
Glicose (g L^{-1})	Y904	$11,83^{Aa}$	$4,36^{Ab}$
	C22	$2,07^{Bb}$	$6,37^{Aa}$
Frutose (g L^{-1})	Y904	$57,02^{Ab}$	$91,19^{Aa}$
	C22	$57,94^{Ab}$	$69,50^{Ba}$

^{ABab}Letras minúsculas na linha e maiúsculas diferentes na coluna (para o mesmo Açúcar) diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

A concentração de frutose no vinho foi semelhante (57,47 g L^{-1}, em média) para as duas linhagens adaptadas. Estas foram mais eficientes para utilizar a frutose do que as linhagens não adaptadas. A diferença na utilização da frutose entre as leveduras adaptadas e não adaptadas foram de 13% para a linhagem C22 e 38% para a linhagem Y904.

A diferença observada entre a concentração de frutose das leveduras adaptadas e não adaptadas reforça a importância do processo de adaptação das leveduras.

CERQUEIRA (2013) fermentou caldo de cana-de-açúcar concentrado a 30°Brix e a concentração de açúcares residuais foi em torno de 65 g L^{-1}

De acordo com BAI et al. (2008) na produção industrial de etanol a partir de materiais amiláceos, a concentração de açúcares redutores e açúcares totais não podem ser superiores a 2 g L^{-1} e 5 g L^{-1}, respectivamente. Esta informação significa que apesar do melhor desempenho das leveduras adaptadas, a fermentação com alto teor alcoólico realizada com as linhagens Y904 e C22, adaptadas, proporcionaram a produção de etanol, com teores de açúcares residuais no vinho maiores do que o esperado para a escala industrial. Isso porque a alta concentração de açúcares residuais (75,95 g L^{-1}) resultou em concentrações de etanol (13,60% v v^{-1}), menores do o esperado.

5.3.4. Concentração de etanol no vinho

A concentração média de etanol nos mostos fermentados com as leveduras adaptadas foi igual a 14,25% (v v^{-1}), e 12,95% (v v^{-1}) nas leveduras não adaptadas (Tabela 15). Pelo consumo de açúcar realizado nas fermentações, as concentrações de etanol ficaram dentro do esperado. Em relação às linhagens de leveduras, a produção média de etanol da linhagem C22 (13,92%) foi 4,7% maior do que a produção de etanol da linhagem Y904 (13,2%).

THOMAS et al. (1993) fermentaram mostos de milho com 350 g L^{-1} de sólidos solúveis e produziram 17,1% (v v^{-1}) de etanol em fermentação conduzidas sob 20°C, durante 8 dias. Suplementando o meio com 0,9% de extrato de levedura, o tempo de fermentação para atingir a mesma concentração de etanol foi de apenas 3 dias. Isso indica que a suplementação com nutrientes obtidos a partir do extrato de leveduras permite aumentar a produtividade da fermentação.

Tabela 15. Concentração de etanol no vinho delevedurado (% v v^{-1}).

Adaptação	Linhagem	Teor Alcoólico
Adaptada	C22	$14,64^{A}$
	Y904	$13,20^{C}$
Não adaptada	C22	$13,87^{B}$
	Y904	$12,69^{D}$

^{ABCD}Letras maiúsculas diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

DE MANCILHA et al. (1984) avaliaram 64 linhagens de leveduras para a fermentação de mostos com 100 e 200 g L^{-1} de ART, preparados com caldo de sorgo sacarino. Nas fermentações com 100 g L^{-1} de ART, a concentração de etanol no vinho variou de 5,75% a 6,34% (v v^{-1}). Já nas fermentações com 200 g L^{-1} de ART, a concentração de etanol no vinho variou de 9,33% a 12,29%.

No processo industrial de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, a concentração de etanol no vinho, geralmente, oscila 8 a 9% (v v^{-1}). Comparando este dado com os resultados das concentrações de etanol dos quatro tratamentos estudados, pode-se verificar que em todos eles, a concentração de etanol nos vinhos provenientes das fermentações com as leveduras adaptas foi maior do que normalmente se observa nas fermentações industrias para a produção de etanol. No entanto, as leveduras não foram capazes de metabolizar todos os açúcares, e isto impactou diretamente no rendimento fermentativo do processo.

5.3.5. Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo das fermentações realizadas pelas leveduras adaptadas foi de aproximadamente 9% maior do que o rendimento das fermentações conduzidas pelas leveduras não adaptadas (85,84 e 77,18% respectivamente).

Quanto as linhagens, o rendimento fermentativo das fermentações realizadas pelas linhagens C22 e Y904 foram 82,92% e 80,10%, respectivamente.

De acordo com INGLEDEW (2009), nos processos de fermentação industriais o rendimento fermentativo deve estar entre 90 a 93% do valor teórico, calculado com base na concentração de açúcares redutores totais. Por outro lado, nas usinas brasileiras esses valores de rendimentos, normalmente, são na faixa de 87 a 89 % do valor teórico.

Neste sentido, apesar do rendimento fermentativo apresentado pelas leveduras adaptadas ter sido superior aqueles obtidos com as fermentações com as leveduras não adaptadas, os valores atingidos indicam a necessidade de aperfeiçoamento para viabilizara ampliação do experimento para escala industrial.

5.3.6. Tempo de fermentação e produtividade em etanol

O tempo de fermentação foi padronizado em 24 horas, isso porque nas quatro últimas horas, o desprendimento de CO2 foi praticamente nulo, indicando a incapacidade das leveduras metabolizarem os açúcares restantes.

Nas duas primeiras horas da fermentação, a produtividade na formação de etanol pelas linhagens C22 e Y904 atingiram seus valores máximos (31,64 e 22,85 mL L^{-1} h^{-1}). Após a segunda hora de fermentação, a produtividade nas fermentações utilizando as duas linhagens e manteve-se constante até a oitava hora da fermentação, com um valor médio de 13,10 mL L^{-1} h^{-1} com a linhagem C22 e 12,82 mL L^{-1} h^{-1} com a linhagem Y904. Após a oitava hora de fermentação, a produtividade caiu ciclo após ciclo, chegando a 2,00 mL L^{-1} h^{-1} com a linhagem C22 e 1,71 mL^{-1} L^{-1} h^{-1} com a linhagem Y904.

A produtividade média das leveduras adaptadas e não adaptadas foram iguais a 6,0 e 5,4 mL L^{-1} h^{-1}, respectivamente. A produtividade das linhagens C22 e Y904 foram 5,8 e 5,6 mL L^{-1} h^{-1}, respectivamente. No processo industrial, a concentração de biomassa é em torno de 10% do volume total (semelhante aos valores obtidos no presente trabalho) e a produtividade média trabalhada geralmente é o dobro dos valores apresentados. Contudo, isso em condições de teores de ART no mosto menores do que os utilizados neste estudo. Isso indica que apesar das duas linhagens leveduras conseguirem se adaptar e tolerar as altas concentrações de etanol no meio, essas sofreram mudanças metabólicas que afetaram a velocidade de consumo do substrato e de formação de produtos.

OZMIHCI& KARGI fermentaram mostos de soro de leite concentrado, com concentrações de açúcar entre 25 e 200 g L^{-1}. As maiores concentrações de etanol (7,97% v v^{-1}) e produtividade (6,72 mL L^{-1} h^{-1}) foram verificadas, alimentando as leveduras com 125 g L^{-1} de açúcares. Nas fermentações com 200 g L^{-1}, a concentração de etanol reduziu para 5,1% v v^{-1}, mostrando que as leveduras utilizadas atingiram a capacidade genética para esta condição de meio fermentativo.

LIMTONG et al. (2006) utilizaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, para a fermentação de mosto de caldo de cana com 22% de açúcares totais. A fermentação foi suplementada com 0,05% de sulfato de amônio, 0,05% de fosfato monobásico de potássio, 0,12% de sulfato de magnésio e conduzida sob 37 °C. Ao término da fermentação (72 horas), foram verificados 8,62% (v v^{-1}) de etanol no vinho, com uma produtividade de 1,84 mL L^{-1} h^{-1} e um rendimento fermentativo de 77,5%.

5.3.7. Manitol

As análises cromatográficas dos vinhos demonstraram que apenas as linhagens C22 adaptada e Y904 não adaptada diferiram entre si (3,51 g L^{-1} e 3,96 g L^{-1}, respectivamente) (Tabela 16).

Tabela 16. Concentrações de glicose e frutose residuais no vinho delevedurado.

Adaptação	Linhagem	Manitol (g L^{-1})
Adaptada	C22	$3,51^{B}$
Adaptada	Y904	$3,65^{AB}$
Não adaptada	C22	$3,87^{AB}$
Não adaptada	Y904	$3,96^{A}$

^{ABab}Letras Maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

As menores concentrações de manitol que foram observadas nas leveduras adaptadas podem estar relacionadas com as maiores concentrações de etanol nos vinhos fermentados por essas leveduras. Segundo DOMINGUES (2016), o etanol é o antisséptico mais utilizado e possui pronunciada ação bacteriana. Seu efeito se dá pela desnaturação de proteínas solúveis e diminuição da tensão superficial. Neste sentido, a maior concentração de etanol no vinho fermentado pelas leveduras adaptadas pode ter inibido o crescimento das bactérias láticas, levando a menor concentração de manitol no vinho. Porém, a concentração de ácido lático foi maior nos vinhos fermentados pelas leveduras adaptadas. Logo, a concentração alcoólica não afetou o crescimento das bactérias láticas.

5.3.8. Ácidos orgânicos

5.3.8.1. Ácido lático

As concentrações de médias ácido lático presentes nos vinhos fermentados pelas linhagens C22 e Y904 foram 1,04 e 0,94 g L^{-1}, respectivamente. Em fermentações com as leveduras não adaptadas foram observadas menores concentrações de ácido lático do que nas fermentações conduzidas com as leveduras adaptadas (0,89 g L^{-1} e 1,08 g L^{-1}, respectivamente) (Tabela 17).

Tabela 17. Concentrações de ácidos orgânicos no vinho delevedurado.

Linhagem	Ácido Orgânico (g L^{-1})					
	Adaptação	Lático	Acético	Succínico	Fórmico	Aconítico
Adaptada	C22	$1,10^{A}$	$3,55^{B}$	$1,09^{B}$	$0,17^{A}$	$0,93^{B}$
	Y904	$1,07^{A}$	$3,67^{B}$	$1,13^{B}$	$0,18^{A}$	$0,93^{B}$
Não adaptada	C22	$0,97^{B}$	$5,13^{A}$	$1,56^{A}$	$0,05^{B}$	$1,34^{A}$
	Y904	$0,81^{B}$	$5,43^{A}$	$1,56^{A}$	$0,05^{B}$	$1,47^{A}$

^{ABab}Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância.

De acordo com MAKANJUOLA (1992), contaminações por bactérias láticas podem levar a redução do rendimento fermentativo, menores concentrações de biomassa, redução do uso dos carboidratos, aumento da acidez, devido a produção de ácido lático, redução do pH e formação de espuma.

Apesar de significativa, a concentração de ácido lático não foi o principal fator para a redução da produtividade e do rendimento fermentativo. Isto pode ser explicado porque segundo MAIORELLA et al. (1983), o ácido lático pode inibir o processo de fermentação alcoólica em concentrações na faixa de 10 – 40 g L^{-1}. Isto desconsiderando o efeito sinérgico de outros inibidores que possam ocorrer simultaneamente com o ácido lático.

5.3.8.2. Ácido acético

As concentrações de ácido acético foram maiores nos mostos fermentados pelas leveduras não adaptadas. As concentrações médias de ácido acético verificadas para as leveduras adaptadas e não adaptadas foram 3,61 g L^{-1} e 5,28 g L^{-1}, respectivamente (Tabela 17).

BISCHOFF (2008) fermentou mostos de milho com 17% de açúcares redutores totais, com a adição de 108células de bactérias láticas por litro. As concentrações de ácido acético e ácido lático no vinho foram iguais a 3,1 g L^{-1} e 5,2 g L^{-1}, respectivamente. Nestas condições, a concentração de açúcares residuais foi igual a 45,5 g L^{-1}.

Segundo EGLINTON et al. (2002), o aumento da produção de glicerol pode levar ao aumento da produção de ácido acético pelas leveduras.

A comparação dos resultados com os dados da literatura demonstra que a concentração de ácido acético do vinho foi muito alta, indicando que as leveduras não foram as únicas responsáveis pela síntese desse metabólito.

A menor concentração de ácido acético foi verificada nas fermentações realizadas com as leveduras adaptadas. Isto pode ter duas explicações. A primeira é a maior produção de etanol realizada pelas leveduras adaptas. A segunda explicação é que as leveduras adaptadas foram menos afetadas pelos fatores de estresse do meio. Com isso, menor quantidade de glicerol precisou ser acumulada nas células, levando a menor produção de ácido acético pelas leveduras.

Além da produção de etanol, outro mecanismo que a levedura apresenta para o controle dos micro-organismos "competidores" é a produção de ácido succínico.

5.3.8.3. Ácido succínico

Assim como esperado, a concentração de ácido succínico foi maior nos vinhos fermentados pelas leveduras não adaptadas (1,558 g L^{-1}) do que naqueles vinhos obtidos com a ação das leveduras adaptadas (1,110 g L^{-1}) (Tabela 17). De acordo com GOMES (2012), as concentrações de ácido succínico presentes nos vinhos estão de acordo com os valores verificados no processo industrial.

O ácido succínico é o principal ácido produzido pelas leveduras. De acordo com BASSO et al. (1997), o ácido succínico exerce efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, tornado a levedura mais competitiva no ambiente de fermentação. A maior concentração de ácido succínico foi verificada nos mostos provenientes de fermentações realizadas com as leveduras não adaptadas. Isto está diretamente relacionado com as concentrações de ácido acético. As maiores concentrações de ácido acético induziram à maior produção de ácido succínico, como forma de suprimir os micro-organismos contaminantes presentes no meio. No entanto, os dados podem indicar que o efeito da concentração alcoólica foi superior a concentração de ácido succínico para o controle dos micro-organismos contaminantes.

5.3.8.4. Ácidos fórmico e aconítico

As concentrações de ácido fórmico foram maiores nos vinhos fermentados com as leveduras adaptadas do que nos vinhos provenientes de fermentações utilizando leveduras não adaptadas. Assim como verificado para o ácido lático, esse comportamento pode ter ocorrido devido ao fato das leveduras adaptadas durante as etapas de reciclo por centrifugação terem ficado mais expostas às contaminações ao longo do processo de adaptação. No entanto, ambos os valores são baixos. Os valores de ácido fórmico observados para as leveduras adaptadas e não adaptadas foram 1,08 g L^{-1} e 0,89 g L^{-1}, respectivamente (Tabela 17).

Segundo GUTIERREZ (1989), concentrações até 1,0 g L^{-1} de ácido fórmico não comprometem a produção de etanol, nem a qualidade do álcool produzido. Neste sentido, ambos os valores apresentados estão dentro da faixa aceitável.

Em relação ao ácido aconítico, a concentração desse ácido foi maior (1,41 g L^{-1}) nos mostos fermentados com as leveduras não adaptadas do que nos vinhos obtidos a partir de fermentações com leveduras adaptadas (0,93 g L^{-1}). O ácido aconítico é o principal ácido da cana-de-açúcar, não é produzido por nenhum micro-organismo no processo fermentativo e não foram encontradas referências na literatura que citem este composto como um substrato. Neste sentido, o esperado era que as concentrações fossem semelhantes.

De acordo com STRASSMAN & CECI (1966), o ácido aconítico pode ser utilizado pelas leveduras para a síntese do aminoácido lisina. As leveduras adaptadas produziram mais etanol e consumiram mais ART do que as leveduras não adaptadas. Logo, a maior atividade celular apresentada pelas leveduras adaptadas exigiu maior concentração de nutrientes. Isso pode ter resultado na redução da concentração de ácido aconítico no vinhos fermentados pelas leveduras adaptadas.

5.3.9. Microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas através do microscópio eletrônico de varredura, com aumento de 25.000 vezes, mostraram que a linhagem C22 adaptada apresentou células arredondadas, túrgidas e brotos com as mesmas características. Por outro lado, as células de leveduras dessa linhagem que não foram submetidas ao processo de adaptação, apresentaram-se arredondadas. Contudo, apenas algumas estavam túrgidas. A maioria das células não adaptadas estava levemente enrugada e algumas células apresentaram ruptura da parede celular.

Apesar da percentagem de viabilidade das células de leveduras da linhagem Y904 adaptada e não adaptada ter sido semelhante, as imagens microscópicas demonstraram haviam diferenças significativas na morfologia das células dos dois grupos de leveduras dessa linhagem. As células adaptadas apresentaram formato mais alongado, com dobras distanciadas e profundas. Por outro lado, as células do grupo não adaptadas apresentaram formato elíptico, característico das leveduras. No entanto, a parede celular ficou muito enrugada, com dobras mais próximas e superficiais (Figura 18), características típicas de estresse osmótico segundo CANETTA et al. (2006).

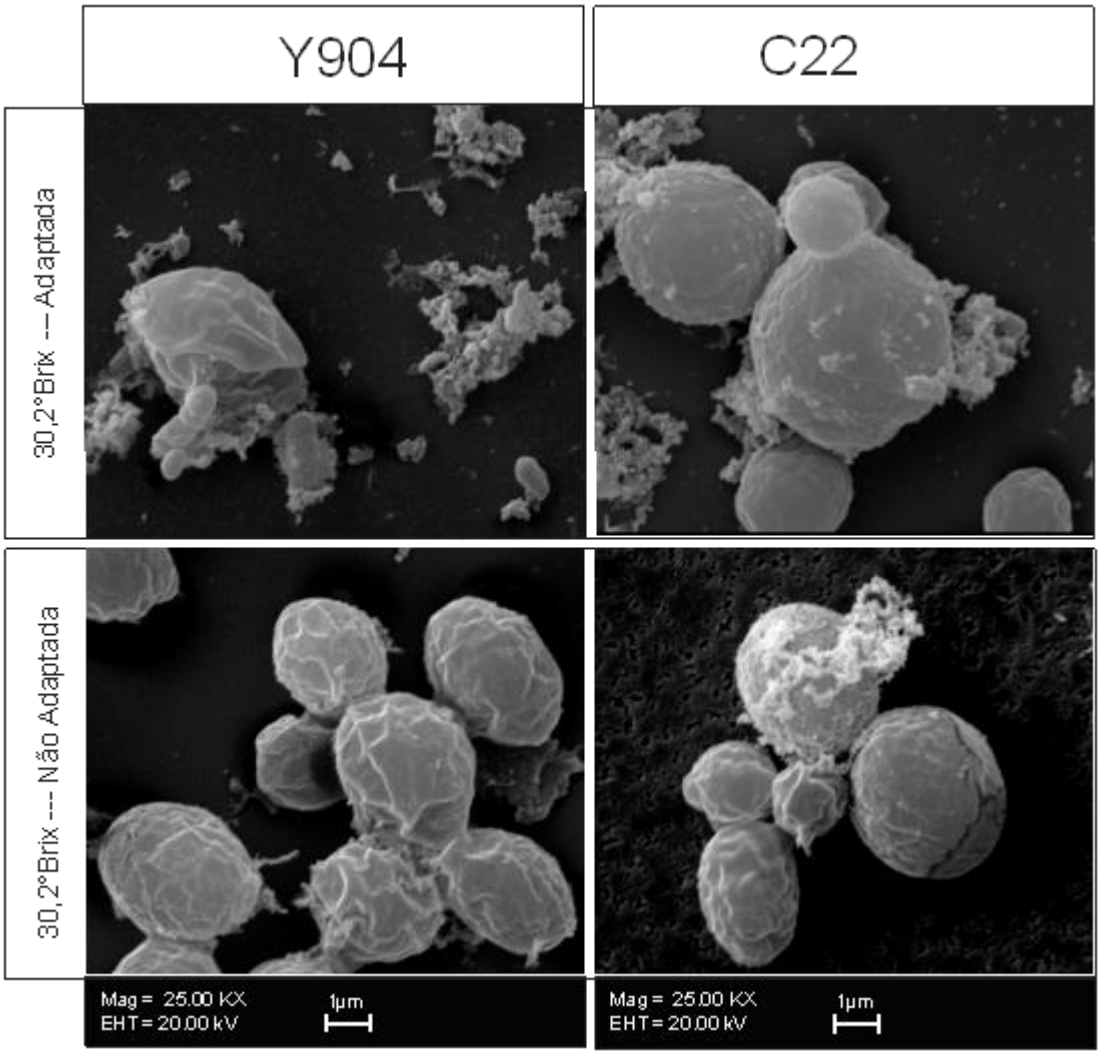

Figura 19. Imagens das leveduras ao término da fermentação com alto teor alcoólico.

Os comportamentos morfológicos das células de leveduras da linhagem Y904, bem como das células da linhagem C22 não adaptadas, indicam que essas leveduras foram afetadas pelo estresse osmótico imposto pelo meio. Isso porque quando as células de *Saccharomyces cerevisiaese* encontram em condição de alta pressão osmótica, seu volume celular é imediatamente modificado, devido à perda de água do citosol (SERRANO, 1996).

CANETTA et al. (2006), verificaram que a exposição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio com 20 % (v v^{-1}) de etanol, durante uma hora, provocou o encolhimento das células, bem como o aumento de sua rugosidade.

VITOR (2014), em outro trabalho, analisou imagens de leveduras obtidas através de microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento de 5.000 vezes, e verificou diferenças morfológicas significativas entre leveduras adaptadas e não adaptadas, quando submetidas à fermentação de substratos com 24°Brix. As principais diferenças observadas foram o formato alongado e o aspecto mumificado (enrugado) das células não adaptadas, indicando que essas células sofreram danos (estresse osmótico) quando colocadas diretamente em mosto com alto teor de açúcar (24 °Brix).

Aliada ao estresse osmótico, a concentração de etanol pode estar associada com as alterações morfológicas apresentadas pelas leveduras. Isto porque em investigação conduzida por MA et al. (2013), foi verificado que quando submeteram leveduras sob condições de meio com teores de etanol considerados médios (7,5%) e altos (10 e 15%), algumas células apresentaram paredes celulares muito finas e em outras a integridade da parede celular foi comprometida.

Isto pode ser explicado pelo fato de que o etanol interage com as membranas através da sua inserção no interior hidrofóbico, provocando o aumento da polaridade dessa região, enfraquecendo assim as interações hidrofóbicas, a barreira hidrofóbica da membrana às trocas livres de moléculas polares e afeta o posicionamento das proteínas na membrana plasmática. Pode-se observar ainda o aumento da fluidez, com consequente aumento de permeabilidade passiva aos íons e aos pequenos metabólitos (INGRAM & BUTTKE, 1984; VITOR, 2014).

A morfologia das células da linhagem C22 adaptada, apresentaram-se pouco afetada pelas altas pressões osmóticas e concentração de etanol do meio.

DINH et al. (2008) observaram que o tamanho das células de levedura adaptadas ao etanol (2,5 a 10% v v^{-1}), aumentaram e a concentração de ácidos graxos foi alterada durante o processo de adaptação. O aumento no tamanho pode ser o fenótipo típico das células de levedura adaptados para elevada concentração de etanol.

Além dos efeitos provocados pela fermentação com alto teor alcoólico, algumas substâncias tóxicas às leveduras podem ter efeito semelhante à pressão osmótica e a concentração de etanol. BENNIS et al. (2004), expuseram células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* sob concentrações de 12 mM dos óleos essenciais (timol e eoginol) e verificaram efeito na morfologia das leveduras semelhante ao observado nas células das leveduras das linhagens Y904 e C22 não adaptadas. Neste sentido, as concentrações dos ácidos lático, acético e de manitol também podem estar associadas às alterações morfológicas verificadas nas células das leveduras das linhagens Y904 e C22 não adaptadas.

6. CONCLUSÕES

● As fermentações conduzidas por batelada simples são mais eficientes para proceder a adaptação das células de leveduras às condições de mosto com altos teores de açúcares e de vinhos com altos teores alcoólicos do que a batelada alimentada intermitente.

● No processo de adaptação a interação dos fatores "Linhagem" e "Concentração de açúcares do mosto" influência a maior parte dos parâmetros avaliados no processo fermentativo (açúcares residuais no vinho, viabilidade celular, produção de biomassa, rendimento fermentativo, produtividade, e a concentração dos ácidos acético, fórmico, lático e succínico).

● O processo de adaptação pode favorecer ou comprometer a morfologia das leveduras de acordo com a linhagem utilizada.

● Na fermentação com alto teor alcoólico a interação dos fatores "Linhagem" e "Adaptação" influência apenas as concentrações de açúcares residuais e o rendimento fermentativo. Os demais parâmetros são influenciados apenas pelo fator adaptação.

● O uso de leveduras previamente adaptadas para o processo de fermentação com alto teor alcoólico, reduz a susceptibilidade das leveduras às alterações morfológicas ocasionadas pela pressão osmótica e concentração de etanol do meio.

REFERÊNCIAS

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo, **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 1982. 58 p.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feed stocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BASÍLIO, A.C.M.; DE ARAÚJO, P.R.L.; DE MORAIS, J.O.F.; DA SILVA FILHO, E.A.; DE MORAIS JR, M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.77-88, 1997

BASSO, L.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo comparativo entre a levedura "turbo" e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. In: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**. Piracicaba, p. 12-25, 2003.

BASSO, L.C.; ROCHA, S.N.; BASSO, T.O. **Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and its Impact on Yeast Fermentation**. INTECH Open Access Publisher, 2011.

BASSO, T.O. Manitol e metabolism bacteriano. In: REUNIÃO ANUAL FERMENTEC, 27°. 2006. **Anais Fermentec**, 2006.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W. Michael. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 87-93, 2001.

BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 34-42, 2001.

BENNIS, S.; CHAMI, F.; CHAMI, N.; BOUCHIKHI, T.; REMMAL, A. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 454-458, 2004.

BERTHELS, N.J.; CORDERO, R.R.O.;BAUER, F.F.;THEVELEINJ.M.; PRETORIOUS I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains, **FEMS Yeast Research**, 4 (2004), pp. 683–689

BISCHOFF, K.; SCOTT, J.S.; LEATHERS, T.; LIU, S.; WORTHINGTON, R.S.; Controlled Antibiotic use during Fuel Ethanol Production. In: **Meeting Abstract**. 2008.

BNDES/CGEE. **Bioetanol de Cana-De-Açúcar: Energia para o Desenvolvimento Sustentável**. BNDES, 2008, p. 71.

BRUMM, P. J.; HEBEDA, R. E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 9, p. 677-682, 1988.

CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 1, 2011.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 23, n. 5, p. 6-9, 2005.

CANETTA, E.; ADYA, A.K., WALKER, G.M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 255, p. 308-315, 2006.

CARNEIRO, L.M. **Avaliação de Estratégias de Adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2011.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 639-646, 1984.

CASTRO, L.A.S. **Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 37p.

CERQUEIRA, P.C. **Fermentação Alcoólica de Mosto com Alta Concentração de Açúcar**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CERRI, C.C.; POLO, A.; ANDREAUX, F.; LOBO, M.C.; EDUARDO, B.P. R**esíduos Orgânicos da Agroindústria Canavieira: 1. Características Físicas e Químicas.** STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.6, n.3, p.34-37, 1988.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). **Normativa P4.231**, Dezembro/2006.

D'AMORE, T.; STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.

DAVIES, J.M.S; LOWRY, C.V.; DAVIES, K.J.A. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 317, n. 1, p. 1-6, 1995.

DE LA TORRE-GONZÁLEZ, F.J.; NARVÁEZ-ZAPATA, J.A.; LÓPEZ-Y-LÓPEZ, V.E.; LARRALDE-CORONA, C.P. Ethanol tolerance is decreased by fructose in Saccharomyces and non-*Saccharomyces* yeasts. **LWT-Food Science and Technology**, v. 67, p. 1-7, 2016.

DE MANCILHA, I. M.; PEARSON, A. M.; WALLER, J.; HOGABOAM, G. J. Increasing alcohol yield by selected yeast fermentation of sweet sorghum. I. Evaluation of yeast strains for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 6, p. 632-634, 1984.

DE OLIVEIRA MENDES, T.A.; PINTO, L.M.; MENDES, D.D.S.O.; MALTA, H.L.; DE SOUZA OLIVEIRA, E. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semi contínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 81, 2013.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparação de Amostras: Materiais Poliméricos, Metálicos e Semicondutores**. EdiPUCRS, 2007.

DINH, T.N.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C.; SHIMIZU, H. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, e 2623, 2008.

DOLAN, T. C. S. Some aspects of the impact of brewing science on Scotch malt whisky production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 3, p. 177-181, 1976.

DOMINGUES, P.F. Desinfecção e desinfetantes. **Apresentação.** Disciplina: HIGIENE ZOOTÉCNICA. FMVZ-UNESP, Botucatu. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/paulodomingues/graduacao/aula5-texto.pdf> Acesso em 30 de abril de 2016.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 177-182, 2006.

EGLINTON, J. M.; HEINRICH, A. J.; POLLNITZ, A. P.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A.; DE BARROS LOPES, M. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. **Yeast**, v. 19, n. 4, p. 295-301, 2002.

EITEMAN, M.A.; CHASTAIN, M.J. Optimization of the ion-exchange analysis of organic acids from fermentation. **Analytica Chimica Acta**, v. 338, n. 1, p. 69-75, 1997.

EITH, C.; KOLB M; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K.H. **Práticas em Cromatografia de Íons**. Monografia (Methrohm). 2ª Edição, p. 1-18, 2006.

ETTRE, L. S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993). Pure and Applied Chemistry, v. 65, n. 4, p. 819-872, 1993.

FAN, S.; XIAO, Z.; ZHANG, Y.; TANG, X.; CHEN, C.; LI, W.; YAO, P. Enhanced ethanol fermentation in a pervaporation membrane bioreactor with the convenient permeate vapor recovery. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 229-234, 2014.

FAPESP, **Nova Tecnologia Reduz Pela Metade a Produção de Vinhaça**. 2010. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/38288/nova-tecnolo-gia-reduz-metade-producao/> Acesso em 30 de abril de 2016.

FERMENTEC, **Exclusividade FERMENTEC que Reduz o Volume de Vinhaça Pela Metade**. Disponível em: <http://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=264> Acesso em 30 de abril de 2016.

FOLCH-MALLOL, J.L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F.; COVARRUBIAS, A.A. La respuesta a estrés em la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latino Americana de Microbiología**, v. 46, n. 1-2, p. 24-46, 2004.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de Cana-de-Açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 203p.

FURLAN, R. M.C.. **Seleção de Leveduras Para a Fermentação com Alto Teor Alcoólico a Partir da Biodiversidade Encontrada em Destilarias Brasileiras**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GALLETI, S.R. Introdução a microscopia eletrônica. **O Biológico**, São Paulo, v. 65, p. 33-35, 2003.

GALLO, C.R (1990) **Determinação da Microbiota Bacteriana de Mosto e de Dornas de Fermentação Alcoólica**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

GIBSON, B.R.; LAWRENCE, S.J.; LECLAIRE, J.P.; POWELL, C.D.; SMART, K.A. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 5, p. 535-569, 2007.

GOMES, F.S. **Antagonismo Entre Leveduras e Bactérias Láticas na Fermentação Alcoólica**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GUTIERREZ, L.E. **Bioquímica de Leveduras**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1997, p.126.

GUTIERREZ, L.E. Efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 45, p. 369-379, 1988.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 48, p. 55-69, 1991.

GUTIERREZ, L.E.; FERRARI, S.E.; ORELLI JUNIOR, A.A. Ácidos orgânicos de caldo de 3 variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em quatro estágios de maturidade. **Anais da Escola Superior de Agricultura" Luiz de Queiroz**, 1989.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; LARSSON, C.U.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GÖRGENS, J.; VAN ZYL, W.H. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 31, 2005.

HAMLEY-BENNETT, C.; LYE, G.J.; LEAK, D.J. Selective fractionation of Sugar Beet Pulp for release of fermentation and chemical feed stocks; optimisation of thermo-chemical pre-treatment. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 259-264, 2016.

INGLEDEW. **The Alcohol Textbook**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009, p. 239-259.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 670-678, 1976

INGRAM, L.O.; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, 1984.

JOHN, G.S.; GAYATHIRI, M.; ROSE, C.; MANDAL, A.B. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 100-105, 2012.

JONES, A.M.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1048-1051, 1994.

LALUCE, C., TOGNOLLI, J. O., DE OLIVEIRA, K. F., SOUZA, C. S., & MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 627-637, 2009.

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4176-4182, 2009.

LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R. **Fermented Beverage Production**. London: Blackie Academic Professional, 1995, 428p.

LEWIS, J.A.; ELKON, I.M.; MCGEE, M.A.; HIGBEE, A.J.; GASCH, A.P. Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. **Genetics**, v. 186, n. 4, p. 1197-1205, 2010.

LIMA, U.A. "Produção de Etanol"; In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W; **Biotecnologia – Tecnologia das Fermentações, vol. 1**, 5.ª Ed; cap. 3; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücherltda, 1992.

MA, M.; HAN, P.; ZHANG, R.; LI, H. Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 59, p. 589-597, 2013.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition Effects on ethanolic fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, Anna; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzymeand Microbial Technology**, v. 14, n. 5, p. 350-357, 1992.

MARQUES, M.O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualização em Produção de Cana-de-Açúcar**. Piracicaba: Editoral, p.369-375, 2006.

METROHMª, **Detectores Para Cromatografia de Íons**. Disponível em: <http://www.metrohm.com/pt-br/produtos-geral/cromatografia-de-ions/ic-detectores/> Acesso em 30 de abril de 2016.

METROHM[b], **IC Column Catalog**. Disponível em: <http://www.metrohm.com/pt-br/produtos-geral/cromatografia-de-ions/ic-colunas/> Acesso em 30 de abril de 2016.

MOAT A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Fermentation pathways. **Microbial Physiology**, Wiley-LissInc, 2002.

NABAIS, R. C.; SÁ-CORREIA, I.; VIEGAS, C. A.; NOVAIS, J. MInfluence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2439-2446, 1988.

NAVES, R.F.; FERNANDES, F.D.S.; PINTO, O.G.; NAVES, P.L.F. Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia**, v. 6, n. 11, 2010.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 231-241, 1997.

NGANG, J.J.E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

OECD-FAO Agricultural Outlook, **OECD Agriculture Statistics (database), 2015**<http:/dx.doi.org/10.1787/888933229078>. Acesso em 30 de abril de 2016.

OLIVA-NETO, P. **Estudos de Diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras**. Campinas, 1995. 183p. 1995. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)–Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, London, 12: 19-21, 35, 1977.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1, p. 169-174, 2007.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource technology, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PANCHAL, C.J. **Yeast Strain Selection**. New York: Marcel Dekker, 1990. 349 p.

PEREZ, M.; LUYTEN, K.; MICHEL, R.; RIOU, C.; BLONDIN, B. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed **FEMS Yeast Research**, 5 (2005), pp. 351–361

PIDDOCKE, M.P.; KREISZ,S.; HELDT-HANSEN, H.P.; NIELSEN, K.F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, n. 3, p. 453-64, 2009.

PIERCE, J.S. Analysis committee: measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v.76, p.442-443, 1970.

PRATT, P.L.; BRYCE, J.H.; STEWART, G.G. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. Journal of the Institute of Brewing, v. 109, n. 3, p. 218-228, 2003.

PRESCOTT, L.M; HARLEY J.P; KLEIN, D.A. **Microbiology, 7 th Edition**, McGraw-Hill Companies, Inc., New York pp. 38-603, 2008.

PULIGUNDA, P.; SMORGROVICOVA, D.; OBULAN, V.S.R.; KO, S. Very high gravity ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133-1144, 2011.

RFA, **World Fuel Ethanol Production**, Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1456770302650-ba1c280f-bad8> Acesso em 30 de abril de 2016.

ROSE, A.H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts V.2 Physiology and Biochemistry of Yeasts**, London Academic Press, p. 41-53, 1987.

ROSE, A.H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts V.5 Yeast Technology**, London Academic Press, p. 32-517, 1993.

SANTOS, J.; SOUSA M.J.; CARDOSO, H.; INÁCIO J.; SILVA S.; I. SPENCER-MARTINS, I. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations, **Microbiology**, v.154, p. 422–430, 2008.

SAS INSTITUTE, INC. Users Guide: Statistics, Version 5 Edition. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, 1985.

SERRANO, R. Salt tolerance in plants and microorganisms: Toxicity targets and defense responses. **International Review of Citology**, Amsterdam, v. 165, p. 1-52, 1996.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401-408, 2004.

SOPRAL. Avaliação do Vinhoto como Substituto do Óleo Diesel e Outros Usos. **Coleção SOPRAL**, n° 10. Sociedade de Produtores de Açúcar e Álcool – SOPRAL, São Paulo, 1986.

SPENCER, G.L.; MEADE, G.P. Special reagentes. In: **Cane Sugar Handbook**. New York: Wiley, 1945.

STRASSMAN, M; CECI, L N. Enzymatic formation of cis-homoaconitic acid, an intermediate in lysine biosynthesis in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 22, p. 5401-5407, 1966.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 321-331, 1996.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; JONES, A.M.; INGLEDEW, W.M. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 211-226, 1993.

THOUKIS, G.; UEDA, M.; WRIGHT, D. The formation of succinic acid during alcoholic fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 1965.

TRONCHONI, J.; GAMERO, A.; ARROYO-LÓPEZ, F. N., BARRIO, E.; QUEROL, A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse Saccharomyces wine species and their hybrids during grape juice fermentation. **International Jornal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 237-243, 2009.

UNICA, **Cresce Utilização de Vinhaça de Cana Para Gerar Energia e Como Fertilizante,** 2012. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/39870311920324775593/cresce-utilizacao-de-vinhaca-de-cana-para-gerar-energia-e-como-fertilizante-/> Acesso em 30 de abril de 2016.

UNICA, **Resumo de Atividades Safra 2015/2016**. Disponível em <http://www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=1053474> Acesso em 30 de abril de 2016.

VITOR, T.M.S. **Fermentações em Mostos com Altos Teores de Açúcar**. Tese Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

WHITEAR, A.L.; CRABB, D. High-gravity brewing—Concepts and economics. **The Brewer**, v. 63, p. 60-63, 1977.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 2, p. 84-92, 1976.

YOU, K.M.; ROSENFIELD, C.L.; KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1499-1503, 2003.

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: ESALQ FERMENTEC**, 1996.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S.Volatile acidity. In: **Wine Analysis and Production**. Springer US, 1999. p. 192-198.