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

**Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta
concentração de açúcar em sistema descontínuo alimentado**

Graziela Francischetti

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2017**

Graziela Francischetti
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração
de açúcar em sistema descontínuo alimentado**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2017

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

Francischetti, Graziela

Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar em sistema descontínuo alimentado / Graziela Francischetti. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

83 p.

Dissertação (Mestrado) – USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Biorreator 2. Levedura 3. Peptona 4. Sulfato de amônio I. Título

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por terem me ensinado
valores os quais nunca vão mudar
e sempre trarão bons frutos.
Ao meu esposo Tiago e a minha querida e amada filha
Gabriela razão do meu viver...*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu marido Tiago Valentim Georgette, que insistiu tanto para que eu prestasse o Mestrado, e depois pelo apoio, dedicação e paciência durante a execução do projeto. Sem esse incentivo eu não teria alcançado nada.

À minha família, principalmente aos meus pais, Cida e Sergio, pelo incentivo nos estudos ao longo de toda minha vida, dedicação e carinho.

À minha filha Gabriela, por ser meu maior motivo de luta, por querer ser sempre uma pessoa melhor, minha razão maior de viver.

À minha orientadora Profa Dra. Sandra Helena da Cruz, pelos ensinamentos, incentivo e apoio mesmo eu não possuindo tanto tempo disponível para o projeto.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioetanol (CTBE) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) por fornecer os equipamentos, instalações e recursos necessários ao desenvolvimento do projeto.

À Celina Yamakawa o meu agradecimento pela orientação, sugestões e suporte na condução dos experimentos no CTBE.

Aos funcionários do CTBE Jairo, Herick e Émerson pela ajuda na condução dos experimentos, pelas conversas descontraídas e por disponibilizar tempo para me ensinar a mexer nos biorreatores e equipamentos.

Aos funcionários do Setor de Açúcar e Alcool Pedro Lucentini, Sylvino Torrezan e Rosemary Silva pelo suporte nos experimentos em Piracicaba.

Às meninas companheiras de laboratório e do grupo do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas - LBAB: Anna Flávia, Bianca, Nádia e principalmente à Rafaela pela ajuda.

A CAPES pela concessão da bolsa Mestrado.

EPÍGRAFE

***“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original”***

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Fermentação alcoólica	19
3.2 Importância da composição do meio para o cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	20
3.3 Processo industrial para obtenção de etanol	23
3.3.1 Matéria-prima utilizada no processo de fermentação	24
3.3.2 Condução do processo fermentativo industrial	24
3.3.3 Monitoramento da fermentação	28
3.4 Fermentação com alto teor alcoólico (VHG)	29
3.4.1 Fatores de estresse na fermentação VHG	32
3.5 Indicadores de estresse em leveduras	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Micro-organismo	37
4.2 Materiais	37
4.3 Metodologia de fermentação em sistema descontínuo (fase 1)	37
4.3.1 Preparo do mosto	37
4.3.2 Preparo do inóculo	38
4.3.3 Ensaios de fermentação	38
4.3.4 Análises físico-químicas	39
4.4 Metodologia para fermentação em sistema descontínuo alimentado (fase 2)	39
4.4.1 Preparo do Mosto	40
4.4.2 Preparo do inóculo - propagação das células de levedura	40
4.4.3 Fermentações com reciclo de células	43
4.4.4 Métodos Analíticos	45
4.4.5 Análises microbiológicas	46
4.4.6 Avaliação microbiológica de contaminação bacteriana	46
4.4.7 Avaliação microbiológica de contaminação por outras linhagens de levedura	46
4.5 Cálculos dos parâmetros de fermentação	48

4.6 Análise Estatística.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Ensaios de fermentação em sistema descontínuo (fase 1)	49
5.2 Ensaios de fermentação em sistema descontínuo alimentado (fase 2)	52
5.2.1 Caracterização molecular da linhagem de levedura CAT-1 por cariotipagem	52
5.2.2 Cinética de fermentação da linhagem CAT-1 em mosto VHG em sistema descontínuo alimentado	53
5.2.3 Ensaios de fermentação em sistema descontínuo alimentado	55
5.2.4 Avaliação microbiológica das células de levedura.....	61
5.2.5 Estudo Complementar – Tratamento com Sulfato de Amônio (10 g/L).....	63
6 CONCLUSÃO	69
REFÊRENCIAS	71
ANEXOS.....	81

RESUMO

Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar em sistema descontínuo alimentado

O etanol é o combustível que mais se destaca como alternativa à gasolina no setor do transporte. No entanto, a melhoria da eficiência da fermentação, aprimorando o processo de conversão de biomassa em etanol combustível e reduzindo o custo de produção são desafios ainda pertinentes. Neste cenário, as fermentações com alta concentração de açúcar ou VHG (very high gravity) estão sendo cada vez mais estudadas. A adição de compostos como fonte de nitrogênio pode gerar benefícios para a produção de etanol, entretanto, a maioria dos estudos com suplementação de fontes nitrogenadas é realizada em sistema descontínuo simples e em escala laboratorial, embora os processos fermentativos industriais sejam conduzidos em sistema descontínuo alimentado. Neste contexto, este trabalho visou avaliar o perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar fermentescível e suplementado com as fontes nitrogenadas peptona e sulfato de amônio, nas concentrações 5 e 10 g/L, em sistema de descontínuo simples e descontínuo alimentado com reciclo de células, utilizando diferentes escalas produtivas. Nos experimentos em sistema descontínuo simples, os tratamentos controle e peptona (5 g/L) apresentaram uma melhor produção de etanol, maior rendimento e produtividade em comparação com os demais tratamentos. Nos experimentos em sistema descontínuo alimentado não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e peptona 5 e 10g/L, porém, o tratamento com sulfato de amônio (10 g/L) apresentou parâmetros fermentativos de produção de etanol e produtividade superiores ao tratamento controle, o oposto do descontínuo simples. Os resultados mostraram que quando as células de levedura foram submetidas a concentrações crescentes de açúcar, como é o caso do sistema descontínuo alimentado, ocorre uma adaptação das mesmas, proporcionando melhores resultados, com uma redução no tempo de fermentação para 16h. Além disso, a alta concentração de etanol no meio fermentativo causa um efeito prejudicial às células, já que nos tratamentos onde houve teores mais elevados de etanol ocorreu menor viabilidade e maior quantidade de açúcar residual.

Palavras-chave: Biorreator; Levedura; Peptona; Sulfato de amônio

ABSTRACT

CAT-1 yeast strain fermentation profile in medium with very high gravity in fed batch system

Ethanol is the fuel that stands out as an alternative to gasoline in the transportation sector. However, improving the efficiency of fermentation, improving the process of converting biomass to fuel ethanol and reducing the cost of production are still relevant challenges. In this scenario, fermentations with high sugar concentration or very high gravity (VHG) are being studied more and more. The addition of compounds as a source of nitrogen can generate benefits for ethanol production, however, most of the studies with nitrogen supplementation are carried out in a simple discontinuous system and in laboratory scale, although the industrial fermentation processes are conducted in a fed batch system. In this context, the objective of this work was to evaluate the fermentation profile of the CAT-1 strain in must containing high fermentable sugar concentration and supplemented with nitrogen peptone and ammonium sulfate at 5 and 10 g / L in a simple discontinuous system and fed batch system, fed with recycle of cells, using different productive scales. In the simple discontinuous system experiments, the control and peptone treatments (5 g / L) presented better ethanol production, higher yield and productivity in comparison to the other treatments. However, the treatment with ammonium sulfate (10 g / L) showed fermentative parameters of ethanol production and productivity higher than the control treatment, the opposite of simple discontinuity. The results showed that when the yeast cells were submitted to increasing concentrations of sugar, as is the case of the fed batch system, an adaptation occurs, providing better results, with a reduction in the fermentation time to 16h. In addition, the high concentration of ethanol in the fermentation medium causes a detrimental effect on the cells, since in the treatments with higher levels of ethanol; less viability and more residual sugar were observed.

Keywords: Bioreactor; Yeast; Peptone; Ammonium sulfate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo de uma fermentação em sistema descontínuo alimentado ou Melle-Boinot.....	27
Figura 2 - Aparência do fermentador Bioflo®/CelliGen® 115 (New Brunswick) de 2L, com o frasco de alimentação tipo Schott® acoplado durante a etapa de propagação de células para o tratamento Controle.	43
Figura 3 - Suspensão de células transferidas para o biorreator	44
Figura 4 - Fermentação de mosto suplementado com peptona em sistema descontínuo alimentado, utilizando reator Bioflo®/CelliGen® 115, com o frasco de alimentação tipo Schott® acoplado.....	45
Figura 5 - Box plot de produção de etanol, viabilidade celular e rendimento fermentativo da linhagem CAT-1 submetida a fermentação em sistema descontínuo, com mosto a 30°Brix, sem e com suplementação nitrogenada (peptona ou sulfato de amônio) a 5 ou 10 g/L.....	50
Figura 6 - Perfil das linhagens de leveduras: Amostra CAT-1 LNF; Padrão SA; Padrão PE; Padrão CAT; Padrão BG; Padrão FT 858. Os cromossomos foram separados por eletroforese de campo pulsado.....	53
Figura 7 - Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em biorreator BioFlo® 115, em sistema descontínuo alimentado, a 30 °C e 200 rpm, em mosto sem adição de fonte nitrogenada (controle).....	55
Figura 8 - Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em biorreator BioFlo® 115 de 2L, em sistema descontínuo alimentado, a 30 °C e 200 rpm, mosto sem adição de fonte nitrogenada (controle) e mosto suplementado com peptona (5 g/L ou 10 g/L)	57
Figura 9 - Box plot de produção de etanol, açúcar redutor residual e viabilidade celular da linhagem CAT-1 submetida à fermentação em sistema descontínuo alimentado, com mosto sem e com suplementação nitrogenada (peptona) a 5 ou 10 g/L.....	59
Figura 10 - Aparência das colônias da linhagem CAT-1 cultivadas em meio WLN a 28 °C por 72 horas	62
Figura 11 - Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em biorreator BioFlo® 115 de 2L, em sistema descontínuo alimentado, a 30 °C e 200 rpm, mosto sem adição de fonte nitrogenada (controle) e mosto suplementado com peptona ou sulfato de amônio 10 g/L	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições utilizadas para propagação das células de levedura para os estudos em sistema descontínuo alimentado	40
Tabela 2 - Parâmetros fermentativos ¹ durante fermentação ² da linhagem CAT-1 em mosto a 30°Brix sem e com suplementação nitrogenada em sistema descontínuo	51
Tabela 3 - Composição do mosto ¹ de alimentação no início de cada ciclo fermentativo	56
Tabela 4 - Médias dos parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo alimentado ¹	58
Tabela 5 – Análises microbiológicas durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto sem e com suplementação em sistema descontínuo alimentado	62
Tabela 6 - Médias dos parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo alimentado ¹	65

1 INTRODUÇÃO

O grande desafio nas últimas décadas é ampliar a oferta de energia, promovendo o desenvolvimento com impacto ambiental reduzido e preservando as fontes energéticas. O conceito de energia alternativa, intensamente investigada no século passado, atualmente é sinônimo de energia renovável (VÁSQUEZ, 2007).

As energias renováveis têm o potencial técnico de atender grande parte da crescente demanda energética mundial, independente da sua origem. Existem três aspectos importantes a ressaltar com respeito às energias renováveis: a viabilidade econômica, a sustentabilidade da fonte e a disponibilidade destes recursos para a geração de energia (LAL, 2005). Entre os biocombustíveis o que mais se destaca no setor do transporte é o etanol como alternativa à gasolina.

A participação das energias renováveis na matriz energética brasileira é de 41,2%, sendo os derivados de cana-de-açúcar responsáveis por 15,8% deste; assim, a cana corresponde a 41,1% da matriz energética renovável. Por outro lado, na matriz energética mundial apenas 14,2% são provenientes de fontes renováveis (RESENHA ENERGÉTICA BRASILEIRA, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2016).

O Brasil, um dos maiores produtores mundiais, a produção de cana-de-açúcar na safra 2015/2016 foi de 665,6 milhões de toneladas, um crescimento de 4,9% em relação à safra anterior e a produção de etanol foi de 30,5 bilhões de litros, um incremento de 6,3% em comparação com a safra 2014/2015 (CONAB, 2016).

A melhoria do processo fermentativo tem sido procurada por diferentes caminhos; embora tenha ocorrido o desenvolvimento do setor sucroenergético brasileiro, o processo de produção de etanol carece de aperfeiçoamentos, entre os quais se destacam: (1) a grande quantidade de vinhaça produzida, que é o principal resíduo do setor; (2) o uso intensivo de antibióticos, devido ao nível de contaminantes microbiológicos e de sólidos insolúveis no mosto de fermentação e (3) o teor alcoólico abaixo do desejado, pelo processo praticado pelas usinas brasileiras. Uma estratégia para elevar o potencial de produção de etanol e minimizar os problemas gerados é a fermentação para obtenção de teor alcoólico elevado que pode ser realizada por meio da utilização de mostos mais concentrados em açúcares totais. Este processo é conhecido como tecnologia de fermentação de mosto com teor elevado de açúcares fermentescíveis (very high gravity fermentation technology, VHGF ou ACA) (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Entretanto, a aplicação de tecnologia VHG causa alguns problemas durante a fermentação, devido ao estresse ambiental imposto à célula. O maior deles é a pressão osmótica alta, o que aumenta a lise celular e diminui a viabilidade (KAWA-RYGIELSKA, PIETRZAK, 2014).

Estudos mostram que alterando as condições nutricionais, é possível aumentar a eficiência fermentativa, bem como a sobrevivência das células de levedura em meios com alta concentração de etanol (CASEY; MAGNUS; INGLEDEW, 1984; KALMOKOFF; INGLEDEW, 1985). Cruz, Batistote e Ernandes (2003) e Batistote, Cruz e Ernandes (2006) sugerem que linhagens de *S. cerevisiae* são fortemente afetadas pela complexidade estrutural da fonte de nitrogênio durante a fermentação alcoólica na presença de diferentes fontes de açúcar. Portanto, a possibilidade de se obter alta concentração de etanol no vinho são, principalmente, devido às condições de fermentação, especialmente as nutricionais. A adição de compostos como fonte de fósforo e nitrogênio para o processo de fermentação alcoólica pode gerar uma produção maior de etanol (SILVA et al., 2006).

A adição de nitrogênio assimilável em mosto com alta concentração de açúcares fermentescíveis permite a produção de etanol em concentrações até então consideradas impraticáveis do ponto de vista industrial (CERQUEIRA, 2013).

O interesse no uso das fermentações VHG no atual cenário industrial é focado, principalmente, na redução dos custos de produção. Espera-se que esta tecnologia possa beneficiar a sustentabilidade ambiental do processo pelo decréscimo de consumo de água e energia. Fermentações com alto rendimento de etanol não trarão somente benefícios no balanço energético, mas também um resultado significativo na redução do volume de vinhaça. Haverá uma grande economia e diminuição dos impactos ao ambiente devido às reduções dos custos de transporte da vinhaça e aplicação como fertilizante nas plantações de cana-de-açúcar. Além disso, altos níveis de etanol podem reprimir o crescimento bacteriano durante a fermentação e por esta razão, ocorrerá a diminuição do uso de antibióticos para o controle das contaminações (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Mesmo com todas essas vantagens, a implementação da tecnologia VHG no cenário industrial brasileiro é limitada, pois ainda faltam estudos de tolerância das linhagens utilizadas com a alta concentração de etanol (AMORIM et al., 2011).

A maioria dos estudos apresentados com suplementação de fontes nitrogenadas em fermentações com alta concentração de açúcar é realizada em

sistema descontínuo simples e em escala laboratorial, porém grande parte dos processos fermentativos industriais é conduzida em sistema descontínuo alimentado (FERRARI, 2013). O modo de operação em descontínuo alimentado é reconhecido por amenizar os efeitos de inibição causados pelo produto e pelo substrato no processo de fermentação (LOBATO, 2015).

Neste contexto, este estudo visou avaliar o perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar fermentescível suplementado com as fontes nitrogenadas, peptona e sulfato de amônio, em sistema descontínuo simples e descontínuo alimentado com reciclo de células.

2 OBJETIVO

Avaliar o perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcar fermentescível, sem e com suplementação nitrogenada, utilizando sistema descontínuo simples e sistema descontínuo alimentado com reciclos de células, em diferentes escalas produtivas.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a influência da suplementação das fontes nitrogenadas peptona e sulfato de amônio nas concentrações 5 e 10 g/L em processo descontínuo simples, em comparação ao tratamento controle sem adição de fonte nitrogenada;
- ✓ Avaliar a influência da suplementação da fonte nitrogenada com melhores resultados em processo simples, em descontínuo alimentado e em uma escala maior, com biorreatores de 2L, em comparação ao tratamento controle sem adição de fonte nitrogenada;
- ✓ Comparar as fontes nitrogenadas peptona e sulfato de amônio para fermentação em biorreator.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fermentação alcoólica

O termo fermentação é utilizado, geralmente, para degradação de glicose ou outros nutrientes orgânicos para obtenção energia, conservada na forma de ATP (NELSON; COX, 2000). Assim, a fermentação alcoólica é um processo complexo no qual o etanol é obtido a partir da transformação de açúcares, em uma série de reações bioquímicas, utilizando como agente da fermentação, principalmente, células de levedura.

O passo inicial para a utilização de qualquer açúcar por leveduras é o transporte da molécula através da membrana celular ou sua hidrólise pela ação da enzima invertase (β -frutofuranosidase) seguida pela entrada na célula (STEWART; RUSSELL, 1998). Entretanto, algumas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de transportar a sacarose diretamente para o interior das células devido à presença de transportadores de sacarose (BATISTA et al., 2004).

Os principais micro-organismos produtores de etanol são as leveduras principalmente linhagens de *S. cerevisiae*. Estas leveduras utilizam açúcares como substrato para seu metabolismo, sendo classificadas como micro-organismos facultativos, ou seja, podem catabolizar açúcares para a produção de energia química celular (ATP) pelas vias aeróbia e anaeróbia. No primeiro caso, a etapa é conhecida como respiração, uma molécula de sacarose é oxidada na presença de oxigênio, resultando em gás carbônico e água em quantidades estequiométricas. No segundo caso, etapa conhecida como fermentação alcoólica, uma molécula de sacarose é oxidada na ausência de oxigênio, resultando em etanol e gás carbônico (VENTURINI-FILHO et al., 2013). No entanto, a utilização do açúcar pode ainda ocorrer por uma combinação destas etapas; isto depende de diversos fatores, que incluem a linhagem de levedura e as condições da cultura (VERDUYN et al., 1992).

A primeira etapa do metabolismo dos carboidratos é a conversão de glicose ou frutose em piruvato através da via glicolítica. A produção de piruvato a partir de glicose produz um total líquido de duas moléculas de ATP por molécula de glicose; estes e a redução de duas moléculas de NAD^+ suprem energeticamente a célula de levedura no metabolismo anaeróbico. O destino metabólico do piruvato é diferente, dependendo da espécie de levedura e das condições de cultivo (NELSON; COX, 2000).

A equação simplificada da fermentação alcoólica está apresentada a seguir (NELSON; COX, 2000):

A levedura *S. cerevisiae* é o micro-organismo mais utilizado para a fermentação alcoólica; para este fim, foram selecionadas diversas linhagens, com características metabólicas próprias que são afetadas pelas condições físico-químicas que o processo fermentativo proporciona (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Entre as principais linhagens de leveduras utilizadas pelas destilarias brasileiras estão as selecionadas em processos de fermentações industriais (AMORIM; BASSO; LOPES, 2008).

A maioria das leveduras fermentadoras é mesófila, sendo que a temperatura ótima para a produção industrial de etanol está na faixa de 26 a 35 °C, com média de 30 °C, com um valor ideal de pH entre 4,0 e 5,0 (LIMA, 1975).

3.2 Importância da composição do meio para o cultivo de *S. cerevisiae*

Nos processos fermentativos em que é utilizada a levedura *S. cerevisiae*, os meios devem conter necessariamente uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, além de sais e vitaminas (HORÁK, 1997). Assim, os principais elementos utilizados pela levedura quanto à quantidade são carbono e nitrogênio. Isto sugere que os fluxos de carbono e nitrogênio tanto quanto suas interações constituem parâmetros importantes na regulação do crescimento celular. A coordenação dos fluxos de carbono e nitrogênio pode ser regulada ao nível de assimilação ou do metabolismo, dependendo das condições de crescimento e da natureza da fonte de carbono e nitrogênio (SCHNEPER et al., 2004; SCHURE et al., 1995).

O nitrogênio desempenha funções importantes na fisiologia da levedura e na bioquímica do processo fermentativo: é essencial para o crescimento e multiplicação celular das leveduras, aumenta a tolerância ao etanol e proporciona fermentações mais rápidas, conseqüentemente, com maior rendimento e produtividade (THOMAS; INGLEDEW, 1990).

Devido à importância para as leveduras, o nitrogênio é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das células. Este nutriente é

um constituinte de vários compostos orgânicos encontrados nas células de levedura: 70% estão na forma de proteína; de 8 a 10% são purinas e cerca de 4% são piridinas, o restante encontra-se em compostos solúveis, aminoácidos e nucleotídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

O transporte de nitrogênio através da membrana plasmática da levedura é realizado por meio de permeases. O transporte ativo de aminoácidos pela membrana plasmática de *S. cerevisiae* é mediado por mais de 20 sistemas de transporte específicos. Além destes, a *S. cerevisiae* possui um sistema de transporte geral de aminoácidos, o transportador GAP (“general amino acid permease”), codificado pelo gene GAP1. Essa permease apresenta elevada especificidade para o transporte de substratos, incluindo a maioria do L- e D- isômero de aminoácidos básicos, neutros e ácidos (JAUNIAUX; GRENSON, 1990). Após o transporte, as fontes de nitrogênio são rapidamente acumuladas pelas leveduras na fase inicial da fermentação, onde são necessários aminoácidos para a síntese de proteínas e produção de biomassa, enquanto que o excesso é armazenamento em vacúolos celulares; a insuficiência de compostos nitrogenados no meio pode provocar baixa produção de biomassa e afetar o processo fermentativo (VILANOVA et al., 2007).

A levedura *S. cerevisiae* utiliza nitrogênio nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (ureia) ou amínica (na forma de aminoácido) e pequenos peptídeos e não possui habilidade metabólica para aproveitar o nitrato (VILANOVA et al., 2007; SANTOS, 2008).

A principal via de assimilação do nitrogênio é a via da glutamina, embora todas as vias de assimilação de fontes de nitrogênio, não preferenciais, em algum momento, se cruzam com o metabolismo principal da formação de glutamato e de glutamina. O grupo amina do ácido glutâmico corresponde a aproximadamente 85% da fonte de nitrogênio, e o grupo amida da glutamina é responsável por 15%. Estas reações permitem a síntese de glutamato a partir de α -cetoglutarato e amônia e a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia. Estas reações principais permitem ainda que a glutamina seja a única fonte de nitrogênio, pois pode ser convertida a glutamato. O mesmo pode ocorrer com o glutamato que pode ser convertido em glutamina (COOPER et al., 1992).

Para que estas reações ocorram e os diversos compostos sejam formados são necessários alguns conjuntos de enzimas. Assim, quando a célula de levedura está em um meio com uma fonte de amônia abundante, seja pela conversão de uma

fonte de amônia não preferencial, ou por amônia propriamente dita, a enzima glutamato-desidrogenase (Gdh1 NADP⁺ - dependente) é responsável pela síntese de α -cetoglutarato, intermediário do ciclo do ácido cítrico que gera glutamato (GRENSON et al., 1974 apud MIRANDA Jr., 2012). E o glutamato pode se combinar com a amônia para formar a glutamina, reação catalisada pela enzima glutamina sintetase, Gin1 (MITCHELL; MAGASANIK, 1983).

Os peptídeos, outra fonte de nitrogênio utilizada pela levedura *S. cerevisiae*, são transportados para o interior da célula via transporte ativo. Este é um processo bioquímico específico em que peptídeos pequenos são transportados via dois sistemas de transportes: o sistema transportador PTR ("Peptide Transport"), onde são transportados dipeptídeos e tripeptídeos e o sistema transportador OPT ("Oligopeptide Transport"), onde são transportados oligopeptídeos contendo de 4 a 5 aminoácidos (WILES et al., 2006).

A diversidade dos compostos nitrogenados, assim como, as quantidades apropriadas são relevantes para que a fermentação seja completa e para a qualidade do produto em processos industriais (STEWART; RUSSELL, 1998). Deficiências de nitrogênio são uma das principais causas de fermentações lentas ou estagnadas (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998; BISSON, 1999). Diversos trabalhos têm demonstrado que em meio contendo sacarose, maltose, glicose ou frutose a suplementação com uma fonte de nitrogênio induz a acumulação de maior biomassa e etanol (CRUZ; CILLI; ERNANDES, 2002; BASTITOTE; CRUZ; ERNANDES, 2006; MIRANDA Jr. et al., 2008; 2009).

A adição de nitrogênio extracelular pode ocasionar uma produção contínua de novas células (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996); a levedura pode obter este elemento dos aminoácidos, sais de amônio, amidas e nitratos. A forma como este nutriente se encontra disponível no meio é de importância vital para as células, sendo que a forma mais favorável para esse aproveitamento é a forma amoniacal, na sua ausência outras fontes são utilizadas. Não existindo nitrogênio na forma amoniacal a levedura usa a forma amídica (ureia) ou amínica (na forma de aminoácidos).

Linhagens industriais de *S. cerevisiae* foram afetadas pela complexidade estrutural da fonte de nitrogênio durante a fermentação de diferentes tipos de açúcar, sendo que as leveduras apresentaram um desempenho fermentativo superior quando a fonte nitrogenada possuía nitrogênio na forma mais complexa,

como os hidrolisados enzimáticos de proteínas (CRUZ; BATISTOTE; ERNANDES, 2003; BASTITOTE; CRUZ; ERNANDES, 2006).

Em fermentações com mosto contendo alta concentração de açúcar suplementando com ureia ($0,96 \text{ g L}^{-1}$) e temperatura a 25°C , Theerarattananoon; Lin; Peng (2008) observaram que a ureia equilibrou a deficiência de nitrogênio durante a fermentação, e prolongou a fase logarítmica de *S. cerevisiae*, resultando em um rendimento maior de etanol.

Assim, conhecendo a necessidade de nitrogênio pelas células, entende-se que na produção de etanol combustível a suplementação com fontes nitrogenadas pode contribuir com o processo, principalmente sabendo que os mostos de todos os cereais, incluindo milho e trigo, são deficientes em nitrogênio assimilável (INGLEDEW, 2005). O mesmo autor sugere que esta deficiência é a causa da maioria das fermentações lentas e das que são interrompidas precocemente de mostos oriundos de matérias-primas amiláceas ou sacarinas.

Cruz et al. (2002) comparando diferentes estruturas de fontes nitrogenadas, obtiveram resultados melhores com fontes mais complexas, tais como peptona. Os autores sugerem que não somente a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio em combinação com a fonte de carbono pode interferir no metabolismo da levedura, mas, também pequenas diferenças bioquímicas entre as linhagens de levedura podem ter um efeito acentuado sobre o desempenho da fermentação.

A quantidade recomendada para a fermentação alcoólica é de 100 a 300 mg de nitrogênio livre (NH_4^+ e R-NH_2) por litro de mosto (AMORIM, 2005).

3.3 Processo industrial para obtenção de etanol

No processo industrial brasileiro, o mosto contendo entre 18 e 22% em açúcares redutores totais (ART) é adicionado sobre a suspensão de células de levedura. A fermentação ocorre entre 6 e 12 horas com temperaturas de 32 a 38°C , atingindo teores alcoólicos de 8 a 11% (v/v). Ao término da fermentação a levedura é separada do vinho mediante centrifugação e a suspensão concentrada de células é submetida a um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0 a 2,5 por 1 a 2 horas para a redução da contaminação bacteriana). Em seguida, as células de levedura retornam para um novo ciclo fermentativo (BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011).

O mosto de fermentação utiliza o caldo de cana-de-açúcar, melaço diluído ou uma mistura de ambos (AMORIM et al., 2011). Na composição do caldo ou melaço de cana-de-açúcar, a sacarose é o componente majoritário, portanto, a sacarose é hidrolisada extracelularmente ou intracelularmente, pela ação da invertase extra ou intracelular (FERNANDES, 2013).

3.3.1 Matéria-prima utilizada no processo de fermentação

A cana-de-açúcar possui em média de 10 a 16% de fibras e de 84 a 90% de caldo; desta composição 75 a 82% representam água e o restante são substâncias sólidas dissolvidas. Os sólidos dissolvidos dividem-se em sacarose (14 a 24%), glicose (0,2 a 1%), frutose (0 a 0,5%) e não açúcares (1 a 2,5%) (ALBUQUERQUE, 2011).

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto industrial, proveniente da fabricação de açúcar, que tem sido amplamente utilizado como fonte de carbono em fermentações com leveduras para produção de etanol (LIU et al., 2013). O melaço, embora apresente menor pureza, contém elementos traços e vitaminas que podem ser usados como potencializadores do crescimento (BEAULIEU et al., 1995 apud YAMAKAWA, 2016).

Biotina, ácido pantotênico e inositol são as três vitaminas essenciais para o crescimento satisfatório da levedura. Biotina normalmente está presente no melaço e ácido pantotênico está presente no caldo cana-de-açúcar. A deficiência de inositol não é crítica. Ainda assim, o mosto de fermentação, a partir de caldo e melaço, precisa ser suplementado com nitrogênio e fósforo, principalmente para fins de propagação de células de leveduras (YAMAKAWA, 2016).

3.3.2 Condução do processo fermentativo industrial

Os biorreatores são reatores nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, que podem ser enzimas ou células vivas (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001; PORTO, 2005). O biorreator, também conhecido como fermentador ou dorna, é o coração de qualquer processo biotecnológico no qual os micro-organismos são utilizados para a obtenção de uma ampla variedade de produtos. Algumas das condições para o bom desempenho de um biorreator são: a concentração de biomassa, o fornecimento de nutrientes, as condições de esterilização, a remoção de produto, agitação, inibição da reação pelo substrato ou produto, controle de temperatura, aeração, ajuste de pH, conhecimento do

metabolismo e atividades microbianas (DOMINGUES, 2001). Assim, o conhecimento da cinética de reação é essencial para a compreensão do funcionamento e utilização de um reator biológico.

De modo geral, um reator pode ser utilizado de maneira descontínua, semicontínua, descontínua alimentado ou contínua (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Devido ao tipo de condução de processo utilizado neste estudo, foram explorados os processos descontínuo e descontínuo alimentado.

3.3.2.1 Fermentação em sistema descontínuo

O processo descontínuo de fermentação, ou fermentação descontínua pode ser descrito como o processo no qual uma solução nutriente (mosto) e o micro-organismo são adicionados ao fermentador, que é mantido sob condições específicas, para que ocorra a fermentação. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processo aeróbicos, antiespumante e ácido ou base para controle de pH. Nesse caso, o volume permanece constante e finalizada a fermentação, descarrega-se a dorna e o meio fermentado segue para os tratamentos finais. Este tipo de fermentação pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividade (CARVALHO; SATO, 2001a), pois quando o substrato é adicionado de uma só vez no início da fermentação ele exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não são de interesse. O uso de processos descontínuos é, praticamente, restrito para fermentações laboratoriais, farmacêuticas e na produção de cachaça (TOSETTO, 2002; PORTO, 2005).

O processo descontínuo tem como vantagem as boas condições de assepsia e a possibilidade de realizar a manutenção sempre que necessário. Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO; SATO, 2001a; SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

3.3.2.2 Fermentação em sistema descontínuo alimentado

O processo descontínuo alimentado é conhecido como fermentação descontínua alimentada.

Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle-Boinot, o qual consiste na reutilização de fermento de um ciclo fermentativo para outro e na alimentação do substrato realizada em um determinado tempo. No Brasil esse processo passou a ser chamado de descontínuo-alimentado ou batelada alimentada (DOMINGUES, 2001). E, o processo descontínuo alimentado com reciclo de células é denominado Melle-Boinot.

Na patente deste processo foi reivindicado o processo de aumento do rendimento fermentativo por meio do reciclo de células em que ao final de cada ciclo fermentativo as células são recuperadas por filtração, centrifugação ou precipitação (YAMAKAWA, 2016).

A utilização do processo descontínuo alimentado se generalizou no Brasil, no final da década de 60 e nos anos 70. Em 1976, quando iniciou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), a maior parte das destilarias estava equipada com este tipo de processo. Atualmente, 85% dos processos industriais utilizam o processo Melle-Boinot e 15% utilizam o processo contínuo (AMORIM et al., 2011).

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como a técnica onde um ou mais produtos gerados permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões para enchimento dos reatores com o meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO; SATO, 2001b).

O desenvolvimento de uma estratégia de alimentação apropriada é um ponto importante em cultivo de fermentação em sistema alimentado descontínuo alimentado. Várias estratégias têm sido aplicadas para a cultura de células de alta densidade de vários micro-organismos (LEE et al., 1999).

Este tipo de processo tem como principal característica o reciclo de células. A separação das leveduras do mosto fermentado é realizada em centrífugas ou sedimentadores pela diferença de dimensões e densidades. Após a separação da levedura do vinho, o fermento é submetido a um tratamento com ácido sulfúrico na cuba de tratamento. As bactérias remanescentes não conseguem sobreviver à alta

concentração de íons hidrogênio, ocorrendo o mesmo com as células mais antigas de levedura, enquanto que as células jovens resistem bem ao pH baixo. Após o tratamento ácido, o fermento retorna ao processo de fermentação na forma de um pé-de-cuba (VIEGAS, 1999; BORGES, 2008).

Figura 1 - Esquema representativo de uma fermentação em sistema descontínuo alimentado ou Melle-Boinot

Fonte: Adaptado de CASTRO, 2013.

O processo descontínuo alimentado é sincronizado com as fases de alimentação, esgotamento, descarregamento, centrifugação, tratamento ácido e limpeza, resultando em um processo que mimetiza um processo contínuo, pois a maioria dos biorreatores está sempre ocupada. No entanto, não alcança a mesma produtividade. Nessa configuração é possível realizar de 2,5 a 3 ciclos de fermentação por dia. O desempenho usual em rendimento fermentativo é de 88 a 91% e a produtividade é de 2 a 3,5 kg etanol/ m³.h. A concentração de etanol no vinho final depende da qualidade do substrato, com melaço o valor típico é de 6 a 8% (v/v) e o valor típico com caldo é de 8 a 12% (v/v). O uso de melaço é mais comum na região nordeste do Brasil e o uso de caldo é o mais comum nas unidades

mais novas na região centro-oeste. A mistura dos dois é predominante na região sudeste (YAMAKAWA, 2016).

A principal vantagem do processo descontínuo alimentado é a comodidade em lidar com a contaminação. O controle é mais rápido quando o foco é detectado. A principal desvantagem é a baixa produtividade quando comparado ao processo contínuo (YAMAKAWA, 2016).

3.3.3 Monitoramento da fermentação

O monitoramento da fermentação é essencial para calcular os principais parâmetros fermentativos como rendimento e produtividade, detectar anomalias no processo seja por contaminação ou inibição. A busca por técnicas em tempo real, economicamente viáveis, tem sido explorada por pesquisadores e a própria indústria. A motivação são as perdas na fermentação devido ao açúcar residual no final da fermentação, desvio de açúcares para subprodutos (células e ácidos orgânicos, glicerol e ésteres). As técnicas de monitoramento na pesquisa facilitam as decisões e auxiliam na elucidação dos fenômenos que ocorrem no processo (YAMAKAWA, 2016).

Uma técnica de monitoramento é a espectroscopia por infravermelho. A região da radiação infravermelha (IR) do espectro eletromagnético pode ser dividida, em: Próximo, Curto, Médio, Longo e Distante.

Análises de compostos utilizando o infravermelho têm sido aplicadas em diferentes áreas. Abordagens baseadas em NIRS (espectroscopia na região do infravermelho próximo) são as mais utilizadas para a determinação de diferentes analitos, principalmente, etanol, glicerol e açúcares (CUADRADO et al., 2005). Ainda, a técnica NIR foi utilizada para a determinação em linha de constituintes em bebidas alcoólicas, tais como cerveja, vinho e bebidas destiladas; Bebidas não alcoólicas tais como sucos de frutas, chás e refrigerantes; entre outros produtos (HUANG et al., 2008).

Para o etanol, o pico mais característico no espectro é observado em 1042 cm^{-1} devido a ligação C-O. A banda de absorção a $2860\text{-}2951\text{ cm}^{-1}$ também está relacionada com etanol e deve-se a ligação C-H de CH_2 e CH_3 . As bandas características observadas na região entre $965\text{ e }1500\text{ cm}^{-1}$ são geradas, principalmente, pela ligação e CH-OH correspondem a açúcares e ácidos orgânicos (WU et al., 2015). Nos últimos anos, o método da técnica de reflexão atenuada

(ATR) aumentou a capacidade de espectroscopia por MIR pela transformada de Fourier (FT-MIR) por proporcionar meios para medir quantitativamente com vários compostos em uma ampla gama de amostras (CUADRADO et al., 2005; YAMAKAWA, 2016).

3.4 Fermentação com alto teor alcoólico (VHG)

As fermentações com teor alcoólico elevado podem ser obtidas com a utilização de mosto mais concentrado em açúcares totais. Este processo, conhecido como tecnologia de fermentação de mosto com alto teor de açúcar fermentescível (very high gravity fermentation technology), refere-se a um processo que envolve a preparação de mosto contendo acima de 25% (p/v) de açúcar (CASEY; MAGNUS; INGLEDEW, 1984) com o objetivo principal de produzir níveis de etanol acima de 15% (v/v) (em torno de 120 g/L) (LI et al., 2009).

O processo de fermentação com alto teor alcoólico visa não só o aumento da produção de etanol, como também possui vantagens técnica, econômica e ambiental. O grande interesse por essa tecnologia reside na redução dos custos de produção do etanol: menor investimento de capital, redução de custos de mão de obra e energia por litro de etanol produzido, redução no consumo de água, facilidades de limpeza e sanitização, melhor assepsia, entre outros (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996).

No entanto, o fator limitante é a tolerância das células de levedura, para suportar o estresse de uma fermentação industrial com teor alcoólico elevado (13 a 16%), quando a média está ao redor de 8 – 9%. Embora a levedura *S. cerevisiae* produza etanol, ela também, é sensível a concentrações desse composto, especialmente, nas fermentações com alto teor alcoólico (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). A característica de tolerância ao etanol está associada a interações e complexidades relativamente simples, o etanol é um inibidor do crescimento das leveduras, atuando sobre a divisão celular e diminuindo a taxa de crescimento. Altas concentrações de etanol reduzem a viabilidade da célula e ocasionam a morte celular (STANLEY et al., 2010; WANG et al., 2013).

A viabilidade das células de levedura em presença de alta concentração de etanol é um pré-requisito para verificar a eficiência fermentativa (HU et al., 2007). Fatores estressantes associados a altos teores alcoólicos tais como: pressão

osmótica devido à alta concentração de açúcar, que é o substrato no início do processo e a forte inibição do etanol durante a fase de produção, pode causar a perda da viabilidade celular de levedura, aumentando o tempo de fermentação (LI et al., 2009).

A fermentação com alto teor de açúcar ainda não é utilizada industrialmente, já que apresenta alguns desafios a serem sanados. Um dos principais problemas é relativo à tolerância limitada das linhagens industriais de leveduras ao etanol, principalmente, em temperaturas ao redor de 35°C, e os induzidos pela pressão osmótica (D'AMORE; STEWART, 1986; JONES; INGLEDEW, 1994). Estudos conduzidos em escala de laboratório mostraram ser possível a produção de até 21% (v/v) de etanol na fermentação de mosto de macerado de trigo com 38% (p/v) de sólidos dissolvidos. Entretanto, estes teores altos de etanol só foram obtidos em temperaturas em torno de 20°C, e após um longo período de fermentação e considerável perda de viabilidade celular (JONES; INGLEDEW, 1994; THOMAS et al., 1994). Existe um fenômeno de sinergia sobre a queda da viabilidade celular induzida pelo alto teor de etanol e aumento da temperatura de fermentação. Assim, em temperaturas mais altas observam-se fermentações com teores máximos de etanol em torno de 12 a 13% (v/v), com um tempo de fermentação de até 30 horas (ALDIGUIER et al., 2004; ALFENORE et al., 2002).

Existem poucos estudos sobre o desempenho de linhagens industriais utilizadas em processos fermentativos industriais brasileiros, com mostos contendo alta concentração de açúcar.

A linhagem industrial PE-2 foi capaz de fermentar até 330 g/L de glicose utilizando meio otimizado e produzir 18,6% (v/L) etanol, com produtividade de 2,4 g/L.h e rendimento em etanol de 93% (PEREIRA et al., 2010a). Em outro estudo, o mesmo grupo de pesquisa, descreveu experimentos com até 15 ciclos de células, na fermentação de mostos concentrados, com produção de 17% (v/v) de etanol (PEREIRA et al., 2011b). Apesar de trabalhar com mosto concentrado e da obtenção de teores elevados de etanol, as condições de estudos são muito diferentes daquelas utilizadas no processo industrial de produção de etanol combustível no Brasil, com o tempo de fermentação variando constantemente; e, em alguns ciclos foi observado 27% de células viáveis.

No estudo de Dellias (2014) foi apresentado que, em uma usina referência no setor sucroalcooleiro no Estado de São Paulo, existe uma fermentação em escala

piloto de 2,5m³, utilizando melaço e temperaturas de fermentação de 28,9°C com teor alcoólico entre 11 e 16% (v/v). Não existem mais dados sobre este processo.

Linhagens comerciais de leveduras brasileiras, foram estudadas por Betite et al. (2012), dentre elas PE-2 e CAT-1, em meio contendo alta concentração de açúcar suplementado com sulfato de amônio ou peptona. Este estudo mostrou que todas as linhagens, em meio suplementado, apresentaram maior acúmulo de biomassa, com utilização eficiente de açúcar e manutenção da viabilidade celular após a depleção de açúcar comparado com as amostras não suplementadas. Esta, por sua vez, resultou em um desempenho fermentativo não eficiente com produção menor de biomassa e uma considerável quantidade de açúcar remanescente no final da fermentação.

O efeito da suplementação de alguns nutrientes em mosto contendo melaço, em uma concentração final de sólidos solúveis entre 330-340g/L foi estudado por Puligundla e Reddy (2010). Diferentes concentrações de ureia e sulfato de magnésio foram adicionadas como suplemento; o teor mais elevado de etanol foi de 12,1% (v/v) atingindo 77,8% de eficiência fermentativa contra 9,8% (v/v) e 63% de eficiência fermentativa da amostra não suplementada.

Nos estudos de Breisha (2010) a adição de sulfato de amônio (5 mg/g de sacarose consumida) produziu 11,6% (v/v) de etanol com o consumo total da sacarose (250 g/L) adicionada, após 48 horas de fermentação. A adição de extrato de levedura em quantidade de 6 g/L em conjunto com tiamina (0,2 g/L) proporcionou produção de etanol de 14% (v/v) em meio contendo 300 g/L de sacarose e 16% (v/v) em meio com 350 g/L de sacarose. No entanto, para esta última concentração foi utilizado um reator, durante as primeiras 12h com adição de ar de 150 dm³ min⁻¹. O rendimento fermentativo foi de 71,4%; 72,1% e 70,6% para as respectivas concentrações.

Schautz (2011) utilizando glicose ou sacarose, como fonte de carbono, e peptona (1%, p/v) como base nitrogenada, observou melhor desempenho fermentativo para as duas linhagens, CAT-1 e PE-2, com maior produção de biomassa e etanol bem como a manutenção da viabilidade celular.

Estudos de fermentação com mosto VHG (25, 30 e 35°Brix) suplementado com sulfato de amônio pelas linhagens CAT-1 e PE-2 em escala de laboratório, Cerqueira (2013) observou que a linhagem CAT-1 produziu 16% (v/v) de etanol e a linhagem PE-2 acima de 15,5% (v/v) para no mosto contendo 30°Brix e

suplementado com 1% de sulfato de amônio. Além disso, a linhagem CAT-1 apresentou melhor performance, suportando a pressão osmótica do meio e apresentando produtividade fermentativa de 5,2 g/L/h.

Estudos de Monteiro (2015) em mosto contendo 30°Brix, a linhagem CAT-1, produziu teores de etanol, em média, de 12,9; 17,1 e 14,4% (v/v), respectivamente, nos tratamentos controle (T1); suplementado com ureia (T2) ou fosfato (T3). Nas mesmas condições, a linhagem PE-2, produziu 14,9 (T1), 15,8 (T2) e 15,8% (v/v) (T3) e a massa úmida da linhagem CAT-1 aumentou de 7% para 16%, na presença de fosfato. A 30° Brix, a CAT-1 produziu mais glicerol no tratamento com fosfato de amônio sendo quase 1g de glicerol por cada 1g de biomassa produzida. A suplementação com ureia teve efeitos benéficos na fermentação VHG possibilitando uma produção maior de etanol, e uma produção menor de glicerol face às outras suplementações nitrogenadas.

3.4.1 Fatores de estresse na fermentação VHG

A presença de teores elevados de etanol no mesmo ambiente de crescimento de organismos unicelulares causa uma série de distúrbios que culminam em alterações na polaridade e fluidez das membranas, causando uma redução de suas propriedades seletivas (BANAT et al., 1998).

Devido a sua natureza química, o etanol apresenta alta afinidade com compostos apolares, manifestada na sua capacidade de se inserir entre os ácidos graxos insaturados da bicamada lipídica da membrana e reduzindo sua barreira hidrofóbica. Essas alterações causam a entrada de moléculas polares por pontos não passíveis de controle, reposicionando muitas proteínas de membrana. Todos esses danos à integridade da membrana dificultam a manutenção do gradiente de concentração e permitem passagem de solutos e íons para o meio intracelular (INGRAM; BUTTKE, 1984; SALGUEIRO; SÁ-CORREA; NOVAIS, 1988). A redução do potencial de membrana é outro problema que ocorre com o aumento dos teores de etanol no meio. Concentrações elevadas de etanol associadas a altas temperaturas inibem a atividade de complexos ATPásicos, prejudicando a manutenção do gradiente eletroquímico, a regulação do influxo e efluxo de prótons e a captação de diversos nutrientes essenciais para as células (LEÃO; VAN UDEN, 1984; PIPER, 1995).

Por outro lado, aumentos nos teores de ácidos graxos insaturados e ergosterol, observados em células submetidas ao estresse etanólico, resultaram numa maior capacidade de sobrevivência desses micro-organismos (VANEGAS et al., 2012).

Outro fator de estresse é a pressão osmótica. Com efeito direto sobre a membrana plasmática, o estresse osmótico atua diretamente sobre o equilíbrio homeostático do organismo (JOHN et al., 2012). Ao entrar em contato com um ambiente hiperosmótico, os micro-organismos tendem a perder água para o meio, levando a um processo de desidratação (MAGER; SIDERIUS, 2002). Dentre as várias medidas de combate a esse estresse destacam-se o bloqueio do crescimento celular através da inibição das fases G1 e G2 do ciclo celular e o aumento dos níveis citoplasmáticos de glicerol (ALEXANDER et al., 2001).

A principal consequência do aumento da pressão osmótica sobre as leveduras é a diminuição da sua viabilidade celular. Esse efeito pode ainda ser potencializado por altas temperaturas e altos teores de etanol, devido a ação sinérgica destes fatores sobre a membrana plasmática das células (JOHN et al., 2012). Uma medida compensatória bastante utilizada e apontada em diversos trabalhos é a adição de diversas fontes nitrogenadas ao meio. Esses estimulam o crescimento microbiano, ampliando a captação de nutrientes essenciais e fortalecendo os mecanismos de respostas a estresse sobre a membrana plasmática (BATISTOTE, 2006; BETITE, 2011; CERQUEIRA, 2013; MONTEIRO, 2015).

3.5 Indicadores de estresse em leveduras

As leveduras quando expostas a diversas condições de estresse sofrem uma série de alterações metabólicas. As vias que estimulam o aumento dos teores de glicerol, trealose e glicogênio são acionados para garantir proteção celular e reserva de carbono e energia. A ativação desses compostos irá alterar toda a dinâmica fisiológica desses micro-organismos, visto que vários precursores desses compostos são substratos associados ou intermediários da via glicolítica, uma das mais importantes na obtenção de energia química em todos os seres vivos (HOHMANN, 2002).

Um dos indicadores mais facilmente identificado por cromatografia é o glicerol. A biossíntese de glicerol é intensificada quando a levedura utiliza processos

anaeróbicos para a obtenção de energia. Sob essas condições, o poder redutor presente nas moléculas de NADH é consumido, produzindo moléculas de NAD⁺ garantindo a manutenção da capacidade fermentativa (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996; WANG et al., 2001). Quando a levedura encontra ambientes com disponibilidade de oxigênio, a produção de glicerol é reduzida a níveis basais, exceto sob condições de baixo potencial osmótico, no qual o glicerol atua como osmorregulador (BLOMBERG; ADLER, 1992).

Tanto o processo de biossíntese de etanol como o de glicerol, utilizam agentes redutores na sua biossíntese. Desta maneira o acúmulo de glicerol no processo fermentativo significará uma redução da eficiência de produção de etanol (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996). Com o intuito de diminuir a eficiência de formação de glicerol, vários trabalhos têm buscado alterar os perfis de expressão de genes que codificam enzimas-chave no seu processo de biossíntese (NISSEN et al., 2001; PAGLIARDINI et al., 2010). Contudo, o glicerol apresenta papel essencial na manutenção da viabilidade celular, principalmente sob condições de altos teores de etanol e pressão osmótica; alterações na produção deste causaram sérios desequilíbrios nas células em decorrência da rápida perda do efeito protetor associado a esse composto (LI et al., 2009).

Os ácidos orgânicos, por sua vez, são formados durante a etapa de fermentação do mosto, na qual ocorre a formação de etanol e do gás carbônico como compostos majoritários, por meio do metabolismo da sacarose pelas leveduras. Sua presença no destilado está relacionada aos cuidados dispensados durante a produção do etanol. Os ácidos acético e láctico são associados, principalmente, à contaminação do mosto por micro-organismos do gênero *Acetobacter* e *Lactobacillus* respectivamente (SCWAN et al., 2001 e CARVALHO-NETTO; ROSA; CAMARGO, 2008). A contaminação da cana-de-açúcar ou do próprio mosto, seja durante a estocagem ou no caldo, permite que parte do substrato se torne passível de fermentações secundárias. Assim, a produção do ácido láctico, em condições anaeróbicas, ocorre nas mesmas condições da fermentação alcoólica: as bactérias presentes no mosto convertem as moléculas de piruvato, gerado durante a etapa de glicólise, em lactato e, quando na presença apenas de leveduras, o piruvato é convertido em etanol. Segundo o Ciclo de Krebs, em condições aeróbicas, a molécula de piruvato passa por uma série de oxidações cumulativas, gerando CO₂, água e energia (32 ATPs). Durante esta etapa, os ácidos

dicarboxílicos (succínico, fumárico, málico, oxalacético) e também o ácido pirúvico, cítrico e aconítico, podem ser formados devido à presença de inibidores enzimáticos (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001).

Nesse processo, ocorre a descarboxilização oxidativa do piruvato, originando a acetil coenzima A (acetil-CoA), iniciando-se o Ciclo de Krebs. Durante o desenvolvimento desse ciclo, a molécula de oxalacetato reage com a acetil-CoA formando citrato, que, após duas descarboxilações oxidativas consecutivas, dá origem ao ácido succínico. Este, por sua vez, é oxidado e em seguida hidrolisado, gerando o ácido málico, o qual é oxidado, regenerando o oxalacetato, fechando o ciclo. A hidrólise catalítica do oxalacetato conduz a formação do ácido oxálico e ácido acético, respectivamente, principalmente devido a presença de fungos (TKACZ; LANGE, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas: Fase 1 fermentação descontínua (etapa de laboratório) e Fase 2, com um aumento de escala, em biorreator de 2L, com sistema descontínuo alimentado. Em ambas as fases foram realizados reciclo de células.

As condições utilizadas em cada etapa estão apresentadas a seguir.

4.1 Micro-organismo

A linhagem de levedura Catanduva – 1 ou CAT-1 liofilizada (LNF Latino Americana, Bento Gonçalves/RS) foi utilizada neste estudo. Esta linhagem é utilizada amplamente nas indústrias produtoras de etanol no Brasil.

4.2 Materiais

O caldo de cana-de-açúcar, adquirido no comércio local, foi extraído em moendas, filtrado em algodão para a retirada de impurezas mais grosseiras e mantido a 4 °C até a utilização.

O melaço foi proveniente da Usina Pederneiras do grupo Zambianco (Tietê, São Paulo) e o açúcar cristal da Usina Boa Vista (Limeira, São Paulo).

4.3 Metodologia de fermentação em sistema descontínuo (fase 1)

Esta etapa foi realizada no laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP, Piracicaba-SP, com conjunto com Airoidi¹ (2015).

4.3.1 Preparo do mosto

O caldo de cana-de-açúcar utilizado, após descongelamento foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm por 15 min.

O melaço foi submetido ao processo de clarificação, de acordo com Masiero (2015): o melaço foi diluído (2x com água) e o pH ajustado para 4,5 com ácido sulfúrico 2M (H₂SO₄). A solução foi submetida a tratamento térmico em autoclave

¹ Rafaela Airoidi. Suplementação nitrogenada de mosto de cana com alta concentração de açúcar. Bolsista PIBIC/CNPq 2015/2016

por 15 minutos e mantida em câmara fria por 48 horas; o sobrenadante foi utilizado como melaço clarificado.

O mosto com alta concentração de açúcares foi preparado com o caldo e o melaço clarificado, quando necessário foi adicionado água destilada para completar o volume de 100 mL e concentração de 300 g/L de ART. A quantidade utilizada, de caldo ou melaço, variou devido à concentração de sólidos solúveis apresentada por cada um.

4.3.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir de um grama de levedura liofilizada inoculada em 100 mL de meio YPD ou YEPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L, esterilizado a 121 °C por 15 minutos). Após homogeneização, os frascos foram incubados a 30 °C em incubadora tipo shaker (New Brunswick, EUA) a 250 rpm por 24 horas. Após a centrifugação (NT 815 - Nova Técnica) a 2000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas, para a propagação do inóculo, em meio contendo caldo de cana (80 g/L de ART), extrato de levedura (10 g/L) e água destilada suficiente para 100 mL. O frasco inoculado foi incubado em incubadora com agitação orbital tipo shaker (New Brunswick, EUA) a 250 rpm, 30 °C por 12 horas.

Após a propagação, o material foi submetido, novamente, ao processo de centrifugação, sendo o sobrenadante descartado e o pellet com as células, utilizado como inóculo nos ensaios de fermentação.

4.3.3 Ensaios de fermentação

Após o preparo do inóculo, o mesmo foi transferido para frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de mosto, a uma concentração inicial de 300 g/L de ART, e incubado à 30 °C em incubadora tipo BOD (TE-391 – Tecnal), sem agitação.

Ao final de cada ciclo fermentativo de 24h, o vinho foi separado por centrifugação a 2000g (NT 815 - Nova Técnica) por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a - 4 °C para as análises físico-químicas posteriores. As células foram ressuspensas em solução salina, centrifugadas novamente e receberam novo mosto para o próximo ciclo de fermentação. Três ciclos fermentativos consecutivos foram realizados.

Os experimentos foram realizados com suplementação das fontes nitrogenadas peptona (peptídeos obtidos pela hidrólise enzimática de proteínas) e

sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), nas concentrações de 5 e 10 g/L. Estas fontes foram escolhidas por apresentarem diferentes graus de complexidade estrutural devendo interferir diretamente no fluxo metabólico das leveduras quanto à assimilação e utilização como fonte nitrogênio e também na mútua interação que deve ocorrer com a fonte de carbono (CRUZ, 2002; MIRANDA Jr et al., 2008).

A suplementação do mosto ocorreu com a adição de 5 mL de solução contendo a fonte nitrogenada para uma concentração final de 5 ou 10 g/L.

Os ensaios foram realizados em duplicata em três experimentos independentes.

4.3.4 Análises físico-químicas

A concentração de açúcar (açúcar redutor total – ART e açúcar redutor – AR) foi analisada pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando uma curva de calibração de glicose a 1g/L. O ART foi analisado após hidrólise ácida da amostra.

A concentração de células (DO) foi obtida a partir da leitura da absorbância (600nm) da amostra convenientemente diluída; a DO foi obtida multiplicando a absorbância pela diluição.

A viabilidade celular foi determinada por contagem direta das células viáveis, em câmara de Neubauer, utilizando o método de coloração da célula com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

O pH do mosto foi determinado em pHmetro (Lucadema) no início e no final de cada ciclo fermentativo.

A concentração de etanol foi obtida em densímetro digital (Anton Paar), após a destilação das amostras por arraste de vapor em destilador (Tecnal TE-012). A densidade da solução é transformada em concentração de etanol de acordo com tabela de conversão apropriada.

4.4 Metodologia para fermentação em sistema descontínuo alimentado (fase 2)

Este estudo foi conduzido de forma a aproximar as condições da realidade industrial. Os experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioetanol (CTBE) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas-SP.

4.4.1 Preparo do Mosto

O mosto para propagação das células foi preparado com caldo de cana, após aquecimento e filtração para retirada das impurezas, suplementado com extrato de levedura (10 g/L) e a fonte nitrogenada (5 ou 10 g/L). A concentração em açúcares redutores totais (ART) para cada etapa da propagação está apresentada na Tabela 1.

O mosto de fermentação foi preparado, no início de cada tratamento, para uma concentração em ART de 350 g/L, sendo que 21% destes açúcares foram provenientes de melaço (resíduo da indústria de açúcar) clarificado e 79% de xarope simples de açúcar. O xarope simples de açúcar foi obtido por diluição de 500 g/L de açúcar cristal, sob aquecimento a 60 °C em tanque com agitação.

O mosto foi preparado em um tanque de mistura de 4 m³ (TM-0602, kroma, Brasil) com bombeamento de melaço e xarope simples de açúcar. O pH do mosto foi ajustado para 6,4 com adição de 0,4 mL/L de H₃PO₄ a 85% e leite de cal a 8°Be. A seguir, o mosto foi aquecido a 95 °C por meio de um loop de resfriamento em um trocador de calor a placas E-0501 (Alfa Laval, Brasil) e, em seguida, foram adicionados 4 ppm de polímero EngDC 100 (EngClarian) a 1 g/L e mantido em repouso durante 10 minutos para a formação de flocos, seguido por resfriamento até 60 °C. Para remover os sólidos arrastados com os flocos foi utilizado a centrífuga Avanti J-26 XP (Beckman Coulter, CA, EUA) com rotor JLA-10500 com velocidade de 6675,2 g (6000 rpm) 15 min e 4 °C (YAMAKAWA, 2016).

O sobrenadante foi coletado e transferido para 8 Erlenmeyers (4 L), correspondente aos 8 ciclos de cada tratamento, o volume de 1.600 mL e, posteriormente, os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos. Os frascos estéreis foram armazenados em temperatura ambiente até o momento da sua utilização.

4.4.2 Preparo do inoculo - propagação das células de levedura

Uma propagação celular foi realizada no início de cada tratamento, sendo que, no total foram preparadas quatro propagações distintas, duas para os tratamentos peptona 5 e 10 g/L, uma para o tratamento controle e, posteriormente, mais uma para o tratamento sulfato de amônio 10 g/L (estudo complementar).

O pré-inoculo foi preparado a partir de uma amostra (0,5 g) da levedura liofilizada, linhagem CAT-1, reativada em 50 mL de água potável estéril e, posteriormente, centrifugada a 2000g (NT 815 - Nova Técnica) por 10 minutos. Após a centrifugação o pellet, contendo as células de levedura hidratadas, foi transferido para frasco Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL de meio YPD ou YEPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L, esterilizado previamente), para a etapa de pré-inóculo. Este frasco foi incubado em incubadora orbital (Innova 44, New Brunswick, EUA) a 250 rpm e 30 °C por 24 horas.

Tabela 1 - Condições utilizadas para propagação das células de levedura para os estudos em sistema descontínuo alimentado

Etapas	Frasco/Propagador	Volume	Meio de Cultivo	Tempo
1ª etapa (Pré-inoculo)	Erlenmeyer (500 mL) / Shaker 250rpm	100 mL	YEPD ¹ líquido CAT 0,5 g	24h
2ª etapa (Inoculo)	Enrlemeyer (500 mL) / Shaker 250rpm	100 mL	CC ² 80 g/L de ART YE ³ 10 g/L Fonte nitrogenada ⁴ 5 ou 10g/L 10 mL do pré-inoculo Água potável q.s.p ⁵ .	12h
3ª etapa (Propagador)	Biorreator (2,2L) / Agitação 600rpm e aeração 1L/min	800 mL	CC 150 g/L de ART YE 10 g/L Fonte nitrogenada 5 ou 10 g/L 50 mL do inoculo Água potável q.s.p	24h
Alimentação da 3ª etapa	Frasco tipo Schott® 2L com mangueira de alimentação	1200 mL	CC 150 g/L de ART YE 10 g/L Fonte nitrogenada 5 ou 10 g/L Água potável q.s.p	-

¹ YEPD – extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L

² CC – caldo de cana;

³ YE – extrato de levedura;

⁴ Fontes nitrogenadas utilizadas: peptona 5 g/L; peptona 10 g/L e sulfato de amônio 10 g/L, no tratamento controle não houve adição de fonte nitrogenada.

⁵ q.s.p. – quantidade suficiente para

A seguir, uma alíquota de 10 mL do pré-inoculo foi transferida para outro frasco Erlenmeyer (500 mL) contendo 90 mL de mosto (caldo de cana, 80 g/L de ART, extrato de levedura, 10 g/L e a fonte nitrogenada utilizada, 5 ou 10 g/L), para obter o inoculo. O frasco foi incubado em incubadora orbital (Innova 44) por 12 horas, nas mesmas condições citadas para o pré-inoculo.

Após o período de incubação, as células foram separadas do meio por centrifugação a $6675,2\text{ g}^2$, 15 min e 4°C em centrífuga (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, CA, EUA). O pellet foi ressuspenso com água potável estéril e transferido ao biorreator esterilizado previamente (etapa de propagação); o biorreator continha mosto (800 mL) preparado com caldo de cana (150 g/L de ART), extrato de levedura (10 g/L) e a fonte nitrogenada utilizada (5 ou 10 g/L) para propagação em sistema descontinuo alimentado por 12 horas.

O mosto de alimentação era constituído por caldo de cana (150 g/L de ART), extrato de levedura (10 g/L) e a fonte nitrogenada utilizada (5 ou 10 g/L); o volume total adicionado foi 1.200 mL, usando um frasco *Schott*[®] de 2L estéril equipado com filtro de respiro e mangueira de silicone. A Figura 2 ilustra como foi realizada a propagação no biorreator do tratamento controle.

As propagações foram realizadas em biorreator Bioflo[®] 115 (New Brunswick, EUA) de 2L, a 30°C , com agitação de 600 rpm e vazão de ar em 0,5 (correspondente a 1 litro por minuto), resultando em uma porcentagem de, aproximadamente, 70% de oxigênio dissolvido no reator. A alimentação foi limitada em 18 g ART / L.h no meio reacional para minimizar a produção de etanol devido ao efeito *Crabtree* (BARFORD; HALL, 1979) e favorecer a multiplicação celular.

Após a propagação, o meio fermentado foi transferido para frasco *Schott*[®] esterilizado. Em condições assépticas (fluxo laminar), o meio foi transferido para garrafas de centrifugação (1L). Em seguida, foi centrifugado na mesma centrífuga anterior $6675,2\text{ g}^2$ a 4°C por 20 minutos. A fase líquida foi descartada e o *pellet* que era sempre ajustado para 200 g (base úmida) foi recuperado e diluindo em água potável estéril até completar o volume de 700 g (aproximadamente 90.000 g/L de células) com o auxílio de um bastão de vidro. Nesse momento era adicionado a fonte nitrogenada com a concentração de 5 ou 10 g/L correspondente ao volume do pé-de-cuba, no tratamento controle não houve essa adição. Essa suspensão celular (pé-de-cuba) foi mantida sob refrigeração (4°C) até o momento do início do ciclo fermentativo.

As condições utilizadas para a propagação celular, como composição dos meios, agitação e tempo estão apresentadas na Tabela 1.

² Centrifugação a 6000 rpm com rotor JLA 10500

Figura 2 - Biorreator Bioflo[®]/CelliGen[®] 115 (New Brunswick) de 2L, com o frasco de alimentação tipo Schott[®] acoplado durante a etapa de propagação de células para o tratamento Controle.

Fonte: Acervo pessoal.

4.4.3 Fermentações com reciclo de células

As fermentações foram realizadas em biorreator Bioflo[®] 115 (New Brunswick, EUA) de 2L a 30 °C, 200 rpm, com ajuste de pH em 4,5 com H₂SO₄ 0,4M e NaOH 0,4M, em anaerobiose em configuração similar ao processo típico brasileiro. O sistema descontínuo alimentado foi escolhido para melhor compreensão dos fenômenos físico-químicos e microbiológicos que ocorrem durante uma fermentação alcólicas, tais como inversão da sacarose, acúmulo de açúcares, comportamento da levedura no início e final da fermentação, sendo que neste final haverá uma alta concentração de etanol.

Um ciclo de uma fermentação adotada neste trabalho corresponde à fermentação propriamente dita, centrifugação, diluição do *pellet* de células e tratamento ácido.

O primeiro ciclo de fermentação começou com a transferência da suspensão de células cultivadas previamente (700 g), com auxílio de uma bomba peristáltica 520U (Watson Marlon, EUA), conforme ilustrado na Figura 3. Para a transferência foi utilizado um frasco Schott[®] de 2L estéril equipado com filtro de respiro e mangueira de silicone. O tratamento ácido iniciou primeiramente com o ajuste da temperatura em 30 °C, agitação a 600 rpm e inserção de 0,2 L/min de ar (com intuito de manter a

pressão positiva e evitar contaminação). Após atingir a temperatura requerida, iniciou-se o tratamento ácido com adição de solução de H_2SO_4 a 2M por meio da injeção de uma seringa no septo de silicone do biorreator até atingir pH 2,5. A injeção foi mantida durante 30 min.

Figura 3 - Suspensão de células transferidas para o biorreator

Fonte: Acervo pessoal.

A seguir, a fermentação era iniciada com o ajuste da rotação em 200 rpm, temperatura de 30°C, interrompendo a inserção de ar, seguida do início do bombeamento do mosto através da bomba peristáltica a uma vazão de 4,6 g/min nas primeiras três horas e após esse tempo foi reduzida para 2,3 g/min. O mosto foi transferido à um frasco *Schott*[®] de 2 L estéril equipado com filtro de respiro e mangueira de silicone. Os dois meios foram pesados em uma balança semi-analítica. Na Figura 4 está apresentado como foram realizadas a fermentação em sistema descontínuo alimentado.

Ao final da fermentação, as células foram recuperadas em centrífuga de refrigerada (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, EUA) com rotor JLA-9100 a 6.000 rpm (7439,2g) a 10°C durante 20 minutos. O vinho foi descartado adequadamente e o *pellet* foi diluído com água potável estéril até o volume total de aproximadamente 700 g, adicionando a fonte nitrogenada correspondente ao volume de pé-de-cuba

para o próximo ciclo. Antes da diluição, a massa de pellet foi ajustada em 200g (massa úmida) para que todos os ciclos iniciassem com aproximadamente a mesma concentração celular. A suspensão celular foi então transferida de volta ao frasco *Schott*[®] e deste ao biorreator para iniciar um novo ciclo de fermentação.

Um novo ciclo de fermentação era iniciado nas mesmas condições descritas anteriormente.

Figura 4 - Fermentação de mosto suplementado com peptona em sistema descontínuo alimentado, utilizando reator Bioflo[®]/CelliGen[®] 115, com o frasco de alimentação tipo Schott[®] acoplado.

Fonte: Acervo pessoal.

4.4.4 Métodos Analíticos

Os açúcares, sacarose e açúcares redutores (glicose e frutose) e etanol foram determinados por espectroscopia de infravermelho médio (MIR) no equipamento Alpha FT-IR (Brucker Optics Inc., EUA), com técnica de reflexão atenuada com diamante de platina de célula de reflexão única (ATR *platinum T Diamond Refl* #263C3643), utilizando-se curvas calibradas e validadas com mosto de caldo e melaço de cana de açúcar, conforme descrito no trabalho de Rivera et al. (2013).

A viabilidade e brotamento celular foram determinados por contagem em câmara de Neubauer com coloração de azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG,

1981; COPERSUCAR, 1987) em microscópio óptico Eclipse CI-S (Nikon, Japão), nas amostras de vinho ao final de cada fermentação.

O pH foi monitorado em tempo real em pHmetro (Mettler Toledo, Brasil), durante as fermentações.

As análises efetuadas durante as amostragens foram °brix (Atago, Japão), e densidade óptica (DO, absorbância a 600 nm, Molecular Devices, EUA).

4.4.5 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas para verificar possíveis contaminações bacterianas ou por outras linhagens de leveduras durante a fermentação, pois contaminações podem afetar os resultados obtidos.

4.4.6 Avaliação microbiológica de contaminação bacteriana

A avaliação microbiológica para verificação da contaminação foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹) realizada pela técnica de plaqueamento em superfície (TORTORA et al., 2000).

Amostras do vinho foram coletadas no final do 2º, 4º, 6º e 8º ciclo de cada tratamento; após diluição conveniente, uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em placas de Petri contendo meio MRSágar (Man, Rugosa, Sharpe, preparado conforme as instruções do fabricante) previamente preparado. A amostra foi espalhada sobre a superfície do ágar, com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em posição invertida a 35°C, durante 48 horas. Os plaqueamentos foram realizados em triplicata.

4.4.7 Avaliação microbiológica de contaminação por outras linhagens de levedura

4.4.7.1 Cariotipagem da levedura liofilizada CAT-1

A cariotipagem foi realizada por laboratório terceirizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

A técnica utilizada foi a de eletroforese de campo pulsado. Ela separa eletroforéticamente os cromossomos de leveduras, na sua forma intacta. A partir da obtenção de um perfil dos cromossomos, esse é comparado com os obtidos para as linhagens que são rotineiramente utilizadas como inóculo nas plantas de

fermentação, como SA-1, CAT-1, PE-2, BG e FT-858. As condições utilizadas para a corrida de eletroforese são adequadas para o gênero *Saccharomyces sensu stricto*.

4.4.7.2 Plaqueamento em meio de cultura WLN

A avaliação microbiológica para verificar contaminação por outras linhagens de levedura foi realizada por plaqueamento em superfície em meio WLN (Wallerstein Laboratory) que devido a presença do corante verde de bromocresol permite além da contagem do número total de células, a diferenciação morfológica entre as colônias.

Os plaqueamentos foram realizados no final do 2º, 4º, 6º e 8º ciclo de cada tratamento. A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹) foi realizada pela técnica de plaqueamento em superfície (TORTORA et al., 2000) com a diluição de 10⁻⁷ do vinho final no meio WLN com ágar previamente de forma asséptica. O processo constituiu-se na inoculação de uma alíquota de 0,1mL da diluição 10⁻⁶ da amostra sobre a superfície do meio solidificado com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em posição invertida a 28°C, durante 72 horas. Os plaqueamentos foram realizados em triplicata.

4.4.7.3 Cultivo das amostras do vinho final em meio YPD

O plaqueamento foi realizado em superfície em meio YPD (YEPD – extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L) as amostras do vinho final 2º, 4º, 6º e 8º ciclo de cada tratamento. A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹) foi realizada pela técnica de plaqueamento em superfície (TORTORA et al., 2000) com a diluição de 10⁻⁷ do vinho final no meio YPD com ágar previamente preparado de forma estéril. O processo constituiu-se na inoculação de uma alíquota de 0,1mL da diluição 10⁻⁶ da amostra sobre a superfície do meio solidificado, com o auxílio de uma alça de *Drigalski*, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em posição invertida a 28°C, durante 72 horas. Os plaqueamentos foram realizados em triplicata.

4.5 Cálculos dos parâmetros de fermentação

Os parâmetros produtividade em etanol e rendimento foram calculados utilizando as massas finais das curvas de tempo:

A produtividade de etanol (g/L.h^{-1}) foi calculada pela equação (LIMA et al., 2001):

$$\text{Pr} = \frac{P}{t_F}$$

na qual P é a concentração do etanol no fim da fermentação em g.L^{-1} e t_F é o tempo de duração da fermentação em horas.

Cálculo do rendimento, Rend (%), da fermentação sobre o açúcar (SIQUEIRA et al., 2008).

$$\text{Rend} = \frac{P}{S\theta \cdot 0,511}$$

na qual $S\theta$ é a concentração do substrato, em g.L^{-1} , que está alimentando o fermentador. O fator 0,511 é devido à estequiometria da fermentação alcoólica, pois 100g de glicose produzem 51,11g de etanol.

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e Testes de Tukey ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS (Statistical Analysis System, Version 9.3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem CAT-1 foi submetida à fermentação de mosto com alta concentração de açúcar, sem e com suplementação com fontes nitrogenadas, em sistema descontínuo (etapa de laboratório – fase 1) e sistema descontínuo alimentado, utilizando fermentador Bioflo[®] (fase 2). Os resultados estão apresentados a seguir.

5.1 Ensaios de fermentação em sistema descontínuo (fase 1)

Os resultados obtidos foram analisados como média de todos os ciclos e a variação na produção de etanol, viabilidade celular e rendimento estão apresentados na Figura 5. Na Tabela 2 está apresentado um resumo destes resultados.

O tratamento controle, mosto sem suplementação (Figura 5), apresentou os melhores resultados de teor alcoólico, embora os valores de viabilidade celular tenham sido os mais baixos. Em termos de produção de etanol, depois do controle os melhores resultados ocorreram com o mosto suplementado com peptona, 5 g/L. Assim, os tratamentos controle e mosto suplementado com peptona (5 g/L) apresentaram melhor produção média de etanol, maior rendimento e produtividade em comparação com os demais tratamentos. Apesar de o controle apresentar açúcar redutor residual em comparação com os outros tratamentos, isto não influenciou para a produção de etanol, tendo somente um efeito nocivo sobre a viabilidade celular (Tabela 2).

No estudo foi evidenciado que os tratamentos que apresentaram piores teores de etanol, apresentaram também menores teores de açúcares residuais, isto pode evidenciar a hipótese que os suplementos aplicados foram mais direcionados para a produção de biomassa do que para a produção de etanol.

Os tratamentos do mosto suplementado com peptona ou sulfato de amônio a 10 g/L apresentaram desempenho fermentativo inferior, com exceção da viabilidade celular a qual apresentou diferença significativa com o controle.

Figura 5 - Box plot de produção de etanol (A), viabilidade celular (B) e rendimento fermentativo (C) da linhagem CAT-1 submetida a fermentação em sistema descontínuo, com mosto a 30°Brix, sem (CR) e com suplementação nitrogenada (peptona, P ou sulfato de amônio, A) a 5 ou 10 g/L.

Tabela 2 - Parâmetros fermentativos¹ durante fermentação² da linhagem CAT-1 em mosto a 30°Brix sem e com suplementação nitrogenada em sistema descontínuo

Parâmetros avaliados	Tratamento ³				
	Controle	Pep 5 g/L	Pep 10 g/L	Am 5 g/L	Am 10 g/L
Etanol (g/L)	82,1a	77,3ab	64,3c	72,8b	64,2c
ARR (g/L)	29,3a	10,7b	4,75b	13,1b	4,75b
Densidade ótica (DO)	72,6a	73,2a	72,3a	68,5a	70,5a
Viab cel (%)	66,1b	85,0a	90,0a	90,1a	90,7a
Rend (%)	53,5a	50,4ab	42,0cd	47,4bc	41,9d
Pr (g/L.h⁻¹)	2,23a	2,10ab	1,75cd	1,98bc	1,71d

¹ Parâmetros: ARR - Açúcar redutor residual; Rend - Rendimento; Pr - Produtividade

² Condições da fermentação: frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de mosto a 300g ART/L, incubados à 30 °C em incubadora tipo BOD, sem agitação

³ Controle - sem adição de fonte nitrogenada; Suplementação com peptona (Pep) ou Sulfato de amônio (Am) no volume total da fermentação.

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si, de acordo com o Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

Nos estudos de Batistote, Cruz e Ernandes (2006) sobre a influência da fonte de nitrogênio no desempenho fermentativo de diferentes linhagens de levedura (provenientes da produção de cerveja e vinho), estas apresentaram desempenho fermentativo melhor no meio YNB (sem fonte nitrogenada) suplementado com peptona (10 g/L). O desempenho no meio suplementado com sulfato de amônio foi sempre inferior.

A linhagem CAT-1, entre outras linhagens, quando cultivadas em meio contendo 22% (m/v) de sacarose e diferentes fontes de nitrogênio em experimentos com agitação, mostraram que, no geral, o meio suplementado com peptona apresentou maior produção de biomassa, consumo de açúcar eficiente e manutenção da viabilidade celular. O meio suplementado com sulfato de amônio apresentou desempenho fermentativo inferior para todas as linhagens analisadas (MIRANDA Jr, 2012).

Betite (2011) estudando linhagens industriais, inclusive a CAT-1, em mosto contendo 30% (m/v) de sacarose e suplementado com peptona ou sulfato de amônio (10 g/L) obteve resultados para a produção de etanol de 9,2% (v/v) ou 74 g/L; 13,0% (v/v) ou 100 g/L e 13,3% (v/v) ou 102 g/L, respectivamente para o meio sem suplementação, suplementado com sulfato de amônio e com peptona.

Ao otimizar o mosto de fermentação, Pereira et al. (2010a) obteve um aumento significativo de produção de etanol, produtividade e viabilidade de leveduras em fermentações VHG. Os autores utilizaram 320 g/L de glicose, uma linhagem de laboratório e a linhagem industrial PE-2. A linhagem PE-2 foi capaz de produzir 18,6% (v/v) ou 147 g/L de etanol, 13,3 g/L de glicerol e 9,6 g/L de biomassa, com uma produtividade correspondente de 2,41 g/L.h⁻¹.

Devido aos resultados obtidos em sistema descontínuo, foi selecionada a continuação do trabalho com mosto contendo melaço de cana sem e com suplementação com peptona utilizando um “scale up” dos experimentos.

5.2 Ensaios de fermentação em sistema descontínuo alimentado (fase 2)

Visando aproximar os estudos da realidade praticada em processos industriais, a escala de trabalho foi aumentada de 1:20 e os ensaios de fermentação foram realizados em sistema de fermentação descontínuo alimentado, utilizando um biorreator Bioflo[®] com controle de aeração, agitação e controle automático de pH.

Inicialmente foram realizados estudos de caracterização da linhagem CAT-1 por cariotipagem e, em seguida, a linhagem CAT-1 foi submetida à fermentação em mosto contendo alta concentração de açúcar, para análise da cinética de fermentação e posterior estudos de suplementação do mosto.

5.2.1 Caracterização molecular da linhagem de levedura CAT-1 por cariotipagem

A cariotipagem é utilizada para caracterizar os micro-organismos presentes no meio, a partir da análise do perfil de bandas dos cromossomos. A técnica utilizada foi a de eletroforese de campo pulsado que separa eletroforéticamente os cromossomos de leveduras, na sua forma intacta. A partir da obtenção de um perfil dos cromossomos, esse é comparado com os obtidos para as linhagens que são rotineiramente utilizadas como inóculo nos processos industriais de fermentação, como SA-1, CAT-1, PE-2, BG e FT-858.

A cariotipagem foi realizada por laboratório terceirizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

O perfil cromossômico da linhagem CAT-1 da LNF (Bento Gonçalves-RS) está apresentado na Figura 6 (coluna 1).

Comparando o perfil da linhagem CAT da LNF com o padrão da CAT-1, comprova-se que a linhagem liofilizada utilizada neste estudo apresenta perfil da linhagem CAT-1.

Figura 6 - Perfil das linhagens de leveduras: Amostra CAT-1 LNF (coluna 1); Padrão SA (coluna 2); Padrão PE (coluna 3); Padrão CAT (coluna 4); Padrão BG (coluna 5); Padrão FT 858 (coluna 6). Os cromossomos foram separados por eletroforese de campo pulsado

Fonte: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

5.2.2 Cinética de fermentação da linhagem CAT-1 em mosto VHG em sistema descontínuo alimentado

O estudo cinético de um processo de biotransformação é importante, pois, permite a aquisição de conhecimento básico do processo. A cinética de biotransformação está relacionada com a velocidade de consumo de substrato e de aparecimento de produto e, no caso mais específico de processos de fermentação utilizando leveduras, também com a velocidade de crescimento celular e o efeito que

estas sofrem por influência das condições do meio em processo (ANDRIETTA, 2007).

Para determinar o comportamento fermentativo da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo alimentado foi realizado um estudo da cinética fermentativa, no qual foram avaliados os parâmetros: produção de etanol e consumo de açúcar; produção de biomassa, avaliada como densidade ótica; concentração de sólidos solúveis e pH. A partir destes resultados foi obtida a produtividade do processo. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.

A alimentação foi realizada a uma vazão de 4,6 g/min nas primeiras três horas e após esse tempo foi reduzida para 2,3 g/min. A alimentação do sistema foi de 8 horas, e as células de leveduras utilizaram mais 8 horas para utilizar completamente os açúcares, totalizando 16 horas de fermentação.

O tempo de fermentação foi determinado pelo acompanhamento dos açúcares redutores na fermentação (Figura 7). A partir da décima quinta hora o açúcar atingiu 8,5 g/L e depois 12,6 g/L, como a variação foi pequena, considerou-se final de processo.

Pode-se verificar na Figura 7, houve um pico de açúcar até o horário em que foi feita a alimentação do mosto, após ocorrendo só o consumo do açúcar. A produtividade ficou também praticamente constante após o término da alimentação com o mosto.

Figura 7 - Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em biorreator BioFlo® 115, em sistema descontínuo alimentado, a 30°C e 200 rpm, em mosto sem adição de fonte nitrogenada (controle).

5.2.3 Ensaios de fermentação em sistema descontínuo alimentado

A linhagem CAT-1 foi submetida à fermentação de mosto suplementado com peptona nas concentrações de 5 g/L e 10 g/L, em comparação com uma fermentação em mosto sem adição de fonte nitrogenada (controle). Cada tratamento foi realizado em 8 ciclos consecutivos, de 16 horas cada.

O intuito do aumentar o número de ciclos de 3 da primeira fase para 8 na segunda foi o de verificar se a viabilidade iria se manter por mais ciclos do que nos

experimentos em escala laboratorial. Outro fator que se buscou observar é se haveria uma adaptação das células durante o aumento gradativo da concentração de açúcares no meio, aumentando, assim, o rendimento fermentativo e, por consequência a produtividade.

A partir dos resultados obtidos para a cinética fermentativa, o tempo de fermentação foi estipulado em 16 horas e a alimentação a uma vazão de 4,6 g/min nas primeiras três horas e após esse tempo foi reduzida para 2,3 g/min.

As características do mosto no início de cada ciclo fermentativo foram analisadas, avaliando a concentração de sólidos solúveis totais e de sacarose, açúcares redutores e açúcares redutores (Tabela 3). A concentração do mosto inicial apresentou em média 36,5°Brix, com 377,5 g ART/L.

Tabela 3 - Composição do mosto¹ de alimentação no início de cada ciclo fermentativo

Tratamento	Ciclo	SST (°Brix)	Sacarose (g/L)	AR (g/L)	ART (g/L)
Controle	1	36,40	301,0	55,5	372,3
	2	36,40	307,5	53,7	377,4
	3	36,60	306,4	56,4	378,9
	4	36,80	308,4	51,6	376,2
	5	36,00	305,0	52,8	373,8
	6	36,80	316,6	54,3	387,6
	7	36,50	316,1	50,1	382,8
	8	36,50	314,6	53,1	384,3
Peptona 5 g/L	1	36,20	304,4	68,1	388,5
	2	35,90	297,0	59,4	372,0
	3	36,00	299,3	63,3	378,3
	4	36,30	293,8	64,2	373,5
	5	36,30	306,1	61,8	384,0
	6	36,30	296,7	60,9	373,2
	7	36,40	284,7	56,1	355,8
	8	36,60	300,1	60,0	375,9
Peptona 10 g/L	1	36,1	285,6	63,7	364,4
	2	38,0	306,6	69,9	392,7
	3	33,2	291,6	71,8	378,8
	4	37,9	295,6	65,5	376,6
	5	37,9	298,1	70,8	384,6
	6	37,6	307,4	70,5	394,1
	7	38,0	291,8	70,1	377,2
	8	35,2	245,0	100,4	358,3

¹ Mosto composto de uma mistura de 21% de açúcares provenientes de melaço e 79% de xarope simples de açúcar

Os resultados de produção de etanol, viabilidade celular, rendimento e produtividade, obtidos nos ensaios em sistema descontínuo alimentado estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em biorreator BioFlo® 115 de 2L, em sistema descontínuo alimentado, a 30 °C e 200 rpm, mosto sem adição de fonte nitrogenada (Controle, -□-) e mosto suplementado com Peptona (5 g/L (-○-) ou 10 g/L (-●-))

Ao avaliar os resultados por ciclo, percebe-se que suplementação do mosto com peptona a 10 g/L proporcionou os melhores resultados para produção de etanol, com máximo de 133 g/L ou 16,9% (v/v), no 5° ciclo fermentativo, rendimento e produtividade (8,3 g/L.h⁻¹ no 5° ciclo), até o 6° ciclo fermentativo; neste tratamento a viabilidade celular da linhagem CAT-1 apresentou valores inferiores aos observados nos outros tratamentos, atingindo em torno de 82% no 8° ciclo.

A produção de etanol e a produtividade do tratamento peptona (10 g/L) foi maior até o 6° ciclo fermentativo, porém no 7° e 8° ciclo foi ao contrário, apresentou as piores quantidades de etanol e pior produtividade, este fenômeno demonstra que se continuasse a fermentação por mais ciclos, a peptona 10 g/L poderia não gerar bons resultados.

Para que se pudesse ter uma comparação entre os três tratamentos, mosto sem suplementação (controle), mosto suplementado com peptona 5 g/L e peptona 10 g/L, os resultados obtidos nos 8 ciclos fermentativos foram tratados como repetições. Assim, a partir dos resultados obtidos em cada tratamento foi obtida uma média geral; um resumo dos resultados médios está apresentado na Tabela 4 e a variação dos resultados de produção de etanol, açúcar redutor residual e viabilidade celular estão apresentados por gráfico Box plot na Figura 9.

Tabela 4 - Médias dos parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em sistema descontinuo alimentado¹

Parâmetros fermentativos²	Tratamentos³		
	Controle	Peptona 5 g/L	Peptona 10 g/L
Etanol (g/L)	119,7a	123,9a	126,3a
ARR (g/L)	8,56a	6,41a	4,18a
DO	26,4b	30,0a	28,8a
Viab cel (%)	95,1a	93,4a	90,8a
Brotamento (%)	13,5a	14,1a	15,6a
Rend (%)	59,2a	62,0a	62,7a
Pr (g/L.h⁻¹)	7,48a	7,76a	7,90a

¹ Condições da fermentação: reator Bioflo 115, de 2L a 30 °C, 200 rpm, com ajuste de pH em 4,5

² ARR - Açúcar redutor residual; DO – densidade ótica; Rend - Rendimento; Pr - Produtividade

³ Controle – sem adição de fonte nitrogenada; Peptona – hidrolisado enzimático de proteínas, adicionado ao volume do pé-de-cuba nas concentrações de 5 ou 10 g/L

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si, de acordo com o Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

Figura 9 - Box plot de produção de etanol (A), açúcar redutor residual (B) e viabilidade celular (C) da linhagem CAT-1 submetida à fermentação em sistema descontínuo alimentado, com mosto sem (CR) e com suplementação nitrogenada (peptona, P) a 5 ou 10 g/L

A análise dos resultados (Tabela 4) mostra que não houve diferença significativa entre os três tratamentos, quanto aos parâmetros fermentativos dos estudos em sistema descontínuo alimentado. Ao contrário dos estudos realizados em sistema descontínuo (primeira fase), onde os melhores resultados foram obtidos com o tratamento controle ou mosto suplementado com peptona 5 g/L (Tabela 2).

A viabilidade e o brotamento são parâmetros importantes para verificar se a levedura consegue se adaptar ao meio e se está apta a produzir etanol. Nos três tratamentos analisados a linhagem CAT-1 apresentou viabilidade mais elevada nos experimentos com sistema descontínuo alimentado do que no sistema descontínuo (na primeira fase), confirmando que é mais vantajoso à célula a adaptação lenta ao meio, uma pressão osmótica muito severa já no início prejudica seu desempenho.

Além disso, a viabilidade celular acima de 75% e o brotamento constante demonstrou que as células de leveduras continuavam saudáveis e reproduzindo-se normalmente, estando aptas para seguirem com mais ciclos fermentativos.

A quantidade de açúcar residual é outro parâmetro importante para avaliar se a fermentação foi bem-sucedida. A presença de açúcar residual significa que, por algum motivo, a levedura não conseguiu utilizar o açúcar, e sem a utilização de açúcar, o etanol produzido é menor.

A adaptação das células de levedura, em mosto com concentrações crescentes de açúcar, como é o caso do sistema descontínuo alimentado, proporcionou consumo de açúcar praticamente total em todos os 8 ciclos fermentativos.

De acordo com Li et al. (2009), tensões severas durante a fermentação com elevado teor alcoólico, como a alta pressão osmótica do açúcar inicial e a forte inibição pelo etanol durante a fase de produção, podem causar a redução da viabilidade celular da levedura, aumentando o tempo de fermentação. No entanto, no presente trabalho, a viabilidade das células de leveduras manteve-se alta (acima de 80%), apesar do alto teor alcoólico formado, como apresentado na Figura 7.

O rendimento elevado de etanol em um curto período de tempo durante a fermentação alcoólica é desejável, pois é um fator economicamente importante na produção industrial do etanol. O rendimento de fermentação e a produtividade são os principais índices avaliados em um processo de fermentação alcoólica. No presente estudo a produtividade apresentou um aumento significativo quando

comparado o sistema descontínuo (1 a 2 g/L.h⁻¹) para a produtividade do sistema descontínuo alimentado (7 e 8 g/L.h⁻¹).

Os valores de produtividade obtidos em cada ciclo são condizentes com dados para sistema descontínuo alimentado, obtidos por outros pesquisadores, na faixa de 6,6 a 7,7 g/L.h⁻¹ (FERRARI, 2013), 5,97 a 9,6 g/L.h⁻¹ (FERREIRA, 2005). No entanto, nestes experimentos não foram utilizados mostos com alta concentração de açúcar.

5.2.4 Avaliação microbiológica das células de levedura

A avaliação microbiológica, por contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹), foi realizada nas amostras de vinho no final do 2°, 4°, 6° e 8° ciclo de cada tratamento.

Na Tabela 5 são apresentadas as médias das unidades formadoras de colônia de cada tratamento. A análise destes dados mostra que no mosto contendo peptona 5 g/L ocorreu as maiores contagens nos meios de cultura YPD e WLN em comparação aos demais, porém esse fator não influenciou em um melhor desempenho deste tratamento.

Quanto à contaminação bacteriana, todas as placas de cultivo em MRS não apresentaram crescimento de bactérias (Tabela 5), o que demonstra que os experimentos foram realizados sem contaminação bacteriana, que poderia alterar os resultados.

Tabela 5 – Análises microbiológicas durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto sem e com suplementação em sistema descontínuo alimentado

Tratamento	Ciclo fermentativo	YPD ¹	WLN ²	MRS ³
		Unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL)		
Controle	2	7,3x10 ⁸	8,3x10 ⁸	<10
	4	7,6x10 ⁸	8,1x10 ⁸	<10
	6	9,2x10 ⁸	8,7x10 ⁸	<10
	8	6,6x10 ⁸	4,6x10 ⁸	<10
Peptona 5 g/L	2	3,2x10 ⁹	2,8x10 ⁹	<10
	4	2,4x10 ⁹	2,3x10 ⁹	<10
	6	9,3x10 ⁸	1,3x10 ⁹	<10
	8	9,2x10 ⁸	9,6x10 ⁸	<10
Peptona 10 g/L	2	3,2x10 ⁸	3,7x10 ⁸	<10
	4	4,1x10 ⁸	7,5x10 ⁸	<10
	6	3,3x10 ⁸	3,8x10 ⁸	<10
	8	2,5x10 ⁸	3,3x10 ⁸	<10

Condições de cultivo: 28°C por 72 horas. 2 Condições de cultivo: 35°C por 48 horas

¹ meio YPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L; ágar, 15 g/L) para contagem de unidades formadoras de colônias

² meio WLN (Wallerstein Laboratory) para análise de contaminação por leveduras

³ meio MRS (Man, Rogosa, Sharpe) para análise de contaminação por bactérias

As colônias obtidas em cultivo no meio WLN apresentaram a mesma característica morfológica, como apresentado na Figura 7, isto implica que não houve contaminação por outras leveduras, que poderia também alterar os resultados ou apresentar resultados diferentes entre os tratamentos.

Figura 10 - Aparência das colônias da linhagem CAT-1 cultivadas em meio WLN a 28°C por 72 horas

Fonte: Acervo pessoal.

5.2.5 Estudo Complementar – Tratamento com Sulfato de Amônio (10 g/L)

Como característica de um estudo complementar foi realizada uma fermentação com oito ciclos consecutivos utilizando como fonte de nitrogênio sulfato amônio 10 g/L suplementados sobre o volume total do fermentador; esta fonte apresentou desempenho inferior na primeira fase do trabalho, fermentação em sistema descontínuo.

Os resultados obtidos nos ensaios em sistema descontínuo alimentado para a linhagem CAT-1 em mosto sem fonte nitrogenada (controle) e mosto suplementado com sulfato de amônio (10 g/L) estão apresentados na Figura 11. Convém ressaltar que os experimentos são individuais, portanto, os resultados de controle são os resultados já apresentados em 5.2.3.

Convém ressaltar que esse tratamento apresentou a partir do 4º ciclo uma quantidade grande de sal precipitado no fermentador, demonstrando que o meio estava supersaturado.

Ao avaliar os resultados por ciclo, percebe-se que suplementação referente ao volume total do fermentador com sulfato de amônio (10 g/L) proporcionou os melhores resultados para produção de etanol, sendo que o sulfato de amônio foram obtidos valores máximos de 140 g/L ou 18% (v/v), no 4º ciclo fermentativo, rendimento e produtividade; no entanto, no mosto com sulfato de amônio a viabilidade celular da linhagem CAT-1 apresentou valores inferiores aos observados nos outros tratamentos, atingindo em torno de 70% no 7º ciclo.

Os resultados obtidos nos oito ciclos fermentativos foram tratados como repetições para que se pudesse ter uma comparação entre os tratamentos, mosto sem suplementação (controle) e mosto suplementado com sulfato de amônio 10 g/L. Assim, a partir dos resultados obtidos em cada tratamento foi obtida uma média geral; na Tabela 6 está apresentado um resumo destes resultados médios.

Figura 11 - Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em biorreator BioFlo® 115 de 2L, em sistema descontínuo alimentado, a 30°C e 200 rpm, mosto sem adição de fonte nitrogenada (Controle, -□-) e mosto suplementado com sulfato de amônio 10 g/L (-▲-)

Tabela 6 - Médias dos parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1 em sistema descontínuo alimentado¹

Parâmetros fermentativos²	Tratamentos³	
	Controle	Amônio 10g/L
Etanol (g/L)	119,7b	131,3a
ARR (g/L)	8,56a	19,0a
DO	26,4a	25,3a
Viab cel (%)	95,1a	81,1b
Brotamento (%)	13,5a	9,36a
Rend (%)	59,2a	62,1a
Pr (g.L/h)	7,48b	8,26a

¹ Condições da fermentação: reator Bioflo 115, de 2L a 30 °C, 200 rpm, com ajuste de pH em 4,5

² ARR - Açúcar redutor residual; DO – densidade ótica; Rend - Rendimento; Pr - Produtividade

³ Controle –sem adição de fonte nitrogenada; Amônio – sulfato de amônio - adicionado ao volume do total da fermentação na concentração de 10 g/L

Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si, de acordo com o Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%

Os resultados analisados por teste de Tukey (Tabela 6) apresentaram diferença significativa entre os tratamentos e comportamento inverso ao da primeira fase, com sistema descontínuo. O tratamento sulfato de amônio 10 g/L apresentou melhores parâmetros fermentativos de etanol produzido e produtividade que o controle. Mesmo assim, sulfato de amônio 10 g/L apresentou o pior resultado para viabilidade celular e mesmo não diferindo estatisticamente uma maior quantidade de açúcar residual, o que demonstra que, como na primeira fase do projeto, essa sobra de açúcar pode ser uma inversão para a produção de biomassa.

Porém, conforme se pode observar na figura 11, o tratamento sulfato de amônio apresenta uma inversão de resultados, a partir do 7º ciclo todos os resultados estão piores que o controle, demonstrando que se fosse continuado o processo fermentativo com mais ciclos, provavelmente o tratamento sulfato apresentaria médias inferiores.

Esse resultado também comprova o efeito prejudicial que a alta concentração de etanol no meio fermentativo pode causar, pois tanto no sistema descontínuo (primeira fase) como no sistema descontínuo alimentado (fase dois), os tratamentos que apresentaram os maiores teores de etanol apresentaram também menor viabilidade e maior açúcar residual.

O etanol é o principal fator de estresse durante o processo fermentativo (AGUILERA et al., 2006). Sabe-se que, durante a fermentação, o aumento da quantidade de etanol pode diminuir gradualmente a viabilidade das células por influenciar a integridade da membrana celular e sua função (PIPER, 1995). A perda da viabilidade leva a uma diminuição na atividade da enzima álcool desidrogenase, devido aos elevados níveis de etanol interno (NAGODAWITHANA; CASTELLANO; STEINKRAUS, 1974).

Pereira et al. (2011) observaram uma relação entre o aumento da quantidade de etanol e o decréscimo da viabilidade, para a linhagem PE-2 em experimentos com mosto VHG. Estes resultados enfatizam a importância da drenagem e do subsequente reciclo das células assim que a fermentação finalizar, para evitar sérias consequências na viabilidade celular.

Em estudo de Wang et al. (2013) foi realizada a suplementação de xilose e etanol e comparados os impactos na viabilidade celular. Foi evidenciado que em fermentação VHG o impacto na levedura é maior pelas altas taxas de etanol no meio do que o estresse osmótico.

Em experimentos de Schautz (2011) com a linhagem CAT-1 em meio YNB, em escala laboratorial, com suplemento de 10 g/L de peptona e sulfato de amônio, a peptona apresentou melhores resultados tanto em etanol produzido quanto em viabilidade celular, apresentando também menores quantidades de açúcar residual do que o sulfato de amônio.

Cerqueira (2013) com experimentos VHG em descontínuo alimentado com 6 ciclos fermentativos, em frascos de 100mL, comparou um tratamento suplementado com sulfato de amônio 24mM (3,17 g/L) a um controle sem adição de fonte nitrogenada a 35°Brix com a linhagem CAT-1. Em seus resultados, com exceção do primeiro ciclo, a produção de etanol foi maior no suplementado com amônio com média de 13,4% (v/v), equivalente a 106 g/L, contra 12,3% (v/v) ou 97 g/L, após 24 horas de fermentação.

Estudos de Betite (2011), em escala laboratorial, com mosto contendo 35% de sacarose, em sistema descontínuo com frascos agitados, após 65h de fermentação, obtiveram produção de etanol de 13,4% (v/v) ou 106 g/L, no tratamento com peptona 10 g/L e 12,6% (v/v) ou 99,3 g/L em meio contendo sulfato de amônio (10 g/L) em comparação ao meio sem suplementação com 8,4% (v/v) ou 65 g/L.

Mais estudos são necessários com aumento de escala e reciclo de células, para comparação de resultados, pois em cada escala e sistema há uma resposta diferente.

6 CONCLUSÃO

A suplementação de mosto com fontes nitrogenadas para produção de etanol necessita de mais estudos, pois há muitas diferenças no aumento da escala e com o descontínuo alimentado.

A adaptação das células de levedura com cultivo em concentrações crescentes de açúcar, como é o caso do sistema descontínuo alimentado, foi benéfico para o processo fermentativo, visto que o consumo de açúcares foi praticamente total em todos os oito ciclos de fermentação. Nos tratamentos em sistema descontínuo alimentado (fase 2), o tempo total da fermentação foi menor, 16h, em comparação a fase 1 (sistema descontínuo) que utilizou 24h, evidenciando a importância da adaptação da levedura aos níveis de açúcar.

A suplementação do mosto com fontes nitrogenadas não apresentou reprodutibilidade dos resultados, que pudesse comprovar melhora do rendimento fermentativo, apesar de que nos estudos com sulfato de amônio (10 g/L), em sistema descontínuo alimentado, foram obtidos os melhores resultados em comparação ao controle, porém esse tratamento apresentou uma inversão dos resultados a partir do 7º ciclo, demonstrando que não continuaria apresentando melhores resultados se fosse seguida a fermentação por mais ciclos.

São necessários mais experimentos com escala semi-industrial e industrial para melhor interpretação do custo-benefício, do uso de suplementação no mosto de fermentação.

Além disso, há a comprovação do efeito prejudicial que alta concentração de etanol no meio fermentativo pode causar, pois nas duas fases do estudo os tratamentos que apresentaram os maiores teores de etanol apresentaram também menor viabilidade e maior açúcar residual.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, F.; PEINADO, R.A.; MILLAN, C.; ORTEGA, J.M.; MAURICIO, J.C. Relationship between ethanol tolerance, H⁺ - ATPase activity and lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 110, n. 1, 34-42, 2006.
- ALBUQUERQUE, F.M. **Processo de fabricação do açúcar**. 3. ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2011. 447p.
- ALEXANDER, M.R.; TYERS, M.; PERRET, M.; CRAIG, B.M.; FANG, K.S.; GUSTIN, M.C. Regulation of cell progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 12, n. 1, p. 53-62, 2001.
- ALEXANDRE, H. CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 20-27, 1998.
- ALFENORE, S.; MOLINA-JOUE, C.; GUILLOUET, S.E.; URIBELARREA, J.L.; GOMA, G.; BENNADIS, L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 67-72, 2002.
- ALDIGUIER, A.S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; GUILLOUET, S.E.; MOLINA-JOUE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2004.
- AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. São Paulo: Fermentec, 2005. 448p.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 5, n. 8, p. 34-37, 2008.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, Springer-Verlag, v. 91, p. 1267–1275, July 2011.
- ANDRIETTA, S.R. **Apostila do Curso de Engenharia de Fermentação**, p. 71 - 99, 2007.
- BANAT, I.M., NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 809-821, Nov. 1998.
- BARFORD, J.P.; HALL, R.J. An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. **Journal of General Microbiology**, n. 114, p. 267-275, 1979.

- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo**. In: AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. Processos de produção de álcool: controle e monitoramento, 2 ed, Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. P. 38-84.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, InTech, Cap. 5, p. 85-100, 2011.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 26-33, 2004.
- BATISTOTE, M. **Estudo fisiológico do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no meio de cultura no metabolismo de leveduras**. 2006. 157p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), UNESP, 2006.
- BATISTOTE, M.; CRUZ, S.H.; ERNANDES, J.R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine strains influenced by the complexity of the nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, p. 84-91, 2006.
- BETITE, V.C. **Comportamento fermentativo de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto com diferentes concentrações de sacarose e fontes estruturalmente complexas de nitrogênio**. 2011. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- BETITE, V.C.; MIRANDA JUNIOR, M.; OLIVEIRA, J.E.; ERNANDES, J.R. Very high gravity sucrose fermentation by Brazilian industrial yeast strains: effect of nitrogen supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, p. 174-178, 2012.
- BISSON, L.F. Struck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 107-119, 1999.
- BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v. 33, n. 8, p. 145-212, 1992.
- BORGES, P.C.S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em descontínuo alimentado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- BREISHA, G.Z. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass Bioenergy**, v. 34, p. 1243-1249, 2010.

- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. 2001 Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. BORZANI, W. (Coord). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blucher, São Paulo, p. 193-204, 2001a.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. 2001 Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. BORZANI, W. (Coord). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blucher, São Paulo, p. 205-218, 2001b.
- CARVALHO-NETTO, O.V.; ROSA, D.D.; CAMARGO, L.E.A. Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16s rDNA gene sequencing. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 5, p. 508-515, 2008.
- 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, p. 639-646, 1984.
- CASTRO, H.F. **Apostila de Processos Industriais II, Indústria Alcooleira**. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 19p., 2013.
- CERQUEIRA, D.P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, 2013.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, Safra 2015/16, quarto levantamento, abril, 2016**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf> Acesso em 14 abr 2017.
- COOPER, T. G.; KOVARI, L.; SUMRADA, R. A.; PARK, H. D.; LUCHE, R. M.; KOVARI, I. Nitrogen catabolite repression of arginase (CAR1) expression in *Saccharomyces cerevisiae* is derived from regulated inducer exclusion. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 48-55, 1992.
- COOPERSUCAR. **Fermentação**. São Paulo Coopersucar, 1987. 434p.
- CROCOMO, O.J.; GUTIERREZ, L.E. Caminhos metabólicos. In: **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 1, p. 177.
- COSTENOBLE, R.; VALADI, H.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; FRANZÉN, C. J. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 16, p. 1483-1495, 2000.
- CRUZ, S.H. **Efeito da natureza da fonte de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em micro-organismos: Estudos enzimáticos e fisiológicos com leveduras Crabtree positivo e negativo**. 2002. 134p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, UNESP, 2002.

- CRUZ, S.H.; CILLI, E.M.; ERNANDES, J.R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 54-61, 2002.
- CRUZ, S.H.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J.R. Effect of Sugar Catabolite Repression in Correlation with the Structural Complexity and Fermentation. **Journal of Institute of Brewing**, London, v. 109, n. 4, p. 349-355, 2003.
- CUADRADO, M.U.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; PÉREZ JUAN, P.M., GÓMEZ-NIETO, M.A. Comparison and joint use of near infrared spectroscopy and Fourier transform mid infrared spectroscopy for the determination of wine parameters. **Talanta**, v. 66, n. 1, p. 218-224, 2005.
- D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 322-330, 1987.
- DELLIAS, M.T.F. **Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica: estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em culturas puras**. 2014. 97f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- DOMINGUES, L.M.A.R. **Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica**. Tese (Doutorado), Universidade do Minho, Escola de Engenharia, 2001.
- FERNANDES, M. **Avaliação do desempenho fermentativo de leveduras geneticamente modificadas na metabolização de sacarose** 2013. 93p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Florianópolis, SC, 2013.
- FERRARI, F.C.S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 2013. 74p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.
- FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em descontínuo-alimentada**. 2005. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2005.
- GRENSON, M.; DUBOIS, E.; PIOTROWSKA, M.; DRILLIEN, R.; AIGLE, M. Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases: evidence for the *gdhA* locus being a structural gene for the NADP-dependent glutamate dehydrogenase. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 128, n. 1, p. 73-85, 1974.
- HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.
- HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica**, v. 1331, p. 41-79, 1997.

- HU, X.H.; WANG, M.H.; TAN, T.; LI, J.R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R.M.; LUO, Z.W. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 175, p. 1479-1487, 2007.
- HUANG, H.; YU, H.; XU, H.; YING, Y. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 3, p. 303–313, 2008.
- INGLEDEW, W.M. Improvements in alcohol technology through advancements in fermentation technology. **Getriede Technologie**, v. 58, p. 308-311, 2005.
- INGRAM, L.; BUTTKE, T. M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 25, p. 253-300, 1984.
- JAUNIAUX, J.C.; GRENSON, M. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *European Journal of Biochemistry*, v. 190, n. 1, p. 39-44, 1990.
- JOHN, G.S.M.; GAYATHIRI, M.; ROSE, C.; MANDAL, A.B. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 100-105, 2012.
- JONES, A.; 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.
- KALMOKOFF, M.L.; INGLEDEW, W.M. Evaluation of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* strain. **Journal of American Society of Brewing Chemistry**, v. 43, p. 189-196, 1985.
- KAWA-RYGIELSKA, J.; PIETRZAK, W. Ethanol fermentation of very high gravity (VHG) maize mashes by *Saccharomyces cerevisiae* with spent brewer's yeast supplementation. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 50-57, 2014.
- LAL, R. World crop residues production and implications of its use as biofuel. **Environmental International**, v. 31, p. 575-584, 2005.
- LEÃO, C.; Van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 774, n. 1, p. 43-48, 1984.
- LEE, J.; LEE, S.Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A.P.J. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 29-48, 1999.
- LEE, S.S., ROBINSON, F.M., WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X.M.; BAI, F.W. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculation yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1079-1086, 2009.

- LIMA, U. A. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v. 1, 285p.
- LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 1 ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. cap. 1, p. 1-40.
- LIU, C.G.; XUE, C.; LIN, Y.H.; BAI, F.W. Redox potencial control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 31, n.2, p. 257-265, 2013.
- LOBATO, F.S. Controle ótimo da fermentação alcoólica em reator batelada alimentada usando computação bio-inspirada. **Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, v. 16, n. 1, p. 03-15, 2015.
- MAGALHÃES, A.C.M. **Fermentação alcoólica**. 2007. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAApoUAG/unidade-vii-fermentacao-alcoolica-parte>> Acesso em: 10 set. 2016.
- MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, p. 1-18, 2002.
- MAGER, W.H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.
- MASIERO, M.O. **O uso de técnicas de análise genética para determinação da persistência e dominância da levedura IQAR/545-1 em fermentações sucessivas com reutilização de células**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, n. 31, v. 3, p. 426-428, 1959.
- MIRANDA JUNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E.M.; ERNANDES, J.R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 191-197, 2009.
- MIRANDA JUNIOR, M.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J.R. Glucose and fructose fermentation by wine yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 3, p. 199-204, 2008.
- MIRANDA JÚNIOR, M. **Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras de etanol: efeito da natureza da fonte de nitrogênio**. 2012. 122f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- MITCHELL, A. P.; MAGASANIK, B. Purification and properties of glutamine synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 119-124, 1983.

- MONTEIRO, B.M.S. **Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. 2015. 138p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, 2015.
- NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentations. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 383-391, 1974.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger, Principles of Biochemistry**. 3a ed. New York: Work Publishers, 2000.
- NISSEN, T.I.; HAMANN, C.W.; KIELLAND-BRANT, M.C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 5, p. 463-474, 2001.
- PAGLIARDINI, J.; HUBMANN, G.; BIDEAUX, C.; ALFENORE, S.; NEVOIGHT, E.; GUILLOUET, S.E. Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 36, p. 1-13, 2010.
- PEREIRA F.B., GUIMARÃES P.M.R., TEIXEIRA J.A., DOMINGUES L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7856–7863, 2010a.
- PEREIRA, F.B., GUIMARÃES P.M.R., TEIXEIRA J.A., DOMINGUES L. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1655-1661, 2010b.
- PEREIRA, F.B., GUIMARÃES P.M.R., TEIXEIRA J.A., DOMINGUES L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011a.
- PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-02. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 1, p. 45-53, 2011b.
- PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, n.2, p. 121-127, 1995.
- PORTO, L.M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores ligados em série**. 2005. 139p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2005.

- PULIGUNDLA, P.; REDDY, O.V.S. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: effect of nutrients. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 82-87, 2010.
- RESENHA ENERGÉTICA BRASILEIRA, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2016. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/documents/10584/3580498/02+-+Resenha+Energ%C3%A9tica+Brasileira+2016+-+Ano+Base+2015+\(PDF\)/66e011ce-f34b-419e-adf1-8a3853c95fd4;version=1.0](http://www.mme.gov.br/documents/10584/3580498/02+-+Resenha+Energ%C3%A9tica+Brasileira+2016+-+Ano+Base+2015+(PDF)/66e011ce-f34b-419e-adf1-8a3853c95fd4;version=1.0)>. Acesso em 20 jan 2017.
- RIVERA, E.C.; YAMAKAWA, C.K.; GARCIA, M.H.; GERALDO, V.C.; ROSSELL, C.E.V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. A procedure for estimation for fermentation kinetic parameters in fed-batch bioethanol production process with cell recycle. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1369-1374, 2013.
- SALGUEIRO, S. P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J. M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 903-909, 1988.
- SANTOS, A.M. **Estudo da influencia da complementação de nutriente no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em descontínuo**. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- SCHAUTZ, L.C.A. **Interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo de linhagens *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas em usinas**. 2011. 31p. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2011.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord). **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blucher, São Paulo, p. 179-192, 2001.
- SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, R. J. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 624-630, 2004.
- SCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; RAEVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 141, p. 1101-1108, 1995.
- SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; DA SILVA, J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 89-96, 2001.
- SILVA, J.A.; SILVA, F.L.H.; ALVES, R.R.N.; SANTANA, D.P. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 695-698, 2006.

- SIQUEIRA, P.F.; KARP, S.G.; CARVALHO, J.C.; STURM, W.; RODRIGUEZ-LEÓN, J.A.; THOLOZAN, J.L.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8156-8163, 2008.
- STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, p. 13-24, 2010.
- STEWART, G.G.; RUSSELL, I. Brewer's Yeast, In: **Brewing Sciences and Technology**, Series III, The Institute of Brewing, London, 1998.
- THEERARATTANANOON, K.; LIN, Y.H.; PENG, D.Y. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high gravity conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1253-1258, 2008.
- THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of particulate materials and osmoprotectants on of very high gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994.
- TOSETTO, G.M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 2002. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, Campinas, 2002.
- TKACZ, J.S.; LANGE, L. **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine**. New York: Springer – Verlag, 2004, 319p.
- THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. Ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2011. 964p.
- VANEGAS, J.M.; CONTRERAS, M.F.; FALLER, R.; LONGO, M.L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, New York, v. 102, n. 3, p. 507-516, 2012.
- VÁSQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 205p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- VENTURINI FILHO, W.G.; BRUNELLI, L.T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F.V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 227-236, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/137501>>.

- VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 7, p. 501-517, 1992.
- VIEGAS, M.C. **Desenvolvimento de um reator de bancada de leite fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras floculantes**. 1999. 86p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- VILANOVA, M. UGLIANO, M., VARELA, C., SIEBERT, T., PRETORIUS, I.S., HENSCHKE, P.A. Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 145-157, 2007.
- WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**, Chichester: John-Wiley, 1998. 350p.
- WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001.
- WANG, L.; ZHAO, X.Q.; XUE, C.; BAI, F.W. Impact of osmotic stress and ethanol inhibition in yeast cells on process oscillation associated with continuous very-high-gravity ethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 133, 2013.
- WILES, A.M.; CAI, H.; NAIDER, F.; BECKER, J.M. Nutrient regulation of oligopeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 152, n. 10, 3133-3145, 2006.
- WU, Z.; XU, E.; LONG, J.; ZHANG, Y.; WANG, F.; XU, X.; JIN, Z.; JIAO, A. Monitoring of fermentation process parameters of Chinese rice wine using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. **Food Control**, v. 50, p. 405-412, 2015.
- YAMAKAWA, C.K. **Avaliação da fermentação alcoólica com reciclo de células de hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar em unidade integrada e autônoma**. 2016. 257p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2016.

ANEXOS

Anexo1. A distribuição das médias e desvios por Bloxplot de açúcar redutor residual (g/L) dos tratamentos Controle (CR) e Sulfato de Amônio 10g/L (A10)

Anexo 2. A distribuição das médias e desvios por Bloxplot de etanol (g/L) dos tratamentos Controle (CR) e Sulfato de Amônio 10g/L (A10)

Anexo 3. A distribuição das médias e desvios por Bloxplot de Dendidade ótica (DO) dos tratamentos Controle (CR) e Sulfato de Amônio 10g/L (A10)

Anexo 4. A distribuição das médias e desvios por Bloxplot de rendimento fermentativo (%) dos tratamentos Controle (CR) e Sulfato de Amônio 10g/L (A10).

Anexo 5. A distribuição das médias e desvios por Bloxplot de produtividade (g.L/h) dos tratamentos Controle (CR) e Sulfato de Amônio 10g/L (A10).

Anexo 6. A distribuição das médias e desvios por Bloxplot de brotamento celular (%) dos tratamentos Controle (CR) e Sulfato de Amônio 10g/L (A10).