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

**Fermentação alcoólica de melaço com alta concentração de açúcar:
efeito da esterilização do mosto e tratamento ácido da levedura**

Graziele Bortolozzo Cabral

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

**Piracicaba
2020**

Graziele Bortolozzo Cabral
Engenheira de Alimentos

Fermentação alcoólica de melaço com alta concentração de açúcar: efeito da esterilização do mosto e tratamento ácido da levedura

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof^a. Dr^a. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

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

Piracicaba
2020

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

Cabral, Grazielle Bortolozzo

Fermentação alcoólica de melaço com alta concentração de açúcar: efeito da esterilização do mosto e tratamento ácido da levedura / Grazielle Bortolozzo Cabral. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

85 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. CAT-1 3. Etanol 4. Reciclo de células I.
Título

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a toda minha querida e amada família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me proporcionar essa maravilhosa experiência e me guiar durante todo o caminho.

Ao meu querido e amado esposo, Marcelo Henrique Cabral, que foi e é meu amigo e companheiro de todas as horas. Sem sua imensa ajuda e incentivo nada disso seria possível.

Aos meus incríveis e amados pais, Viviane e Fernando Bortolozzo, pela criação, dedicação, amor e incentivo que me dão até hoje. Vocês sempre acreditaram em mim.

A minha linda irmã, Caroline, e seu marido Junior, pelos momentos de conselhos e descontração.

A minha querida amiga e Orientadora Sandra Helena da Cruz por ter tornado este mestrado possível, me enriquecendo de conhecimento, incentivando e confiando em meu trabalho.

A todos os funcionários e professores do Setor de Açúcar e Alcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ pelo apoio, colaboração e ensinamentos.

A Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP de Santa Bárbara d'Oeste por me proporcionar a oportunidade de conciliar trabalho e estudos.

A todos os meus estimados amigos pelos momentos de descontração e risadas.

EPÍGRAFE

“Prefiram a minha instrução à prata e o conhecimento ao ouro puro, pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis, nada do que possam desejar compara-se a ela”

Provérbios 8:10-11

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz e os seus planos serão bem-sucedidos”

Provérbios 16:3

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específico.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Agentes da fermentação.....	19
3.2 Mosto de fermentação.....	22
3.2.1 Melaço de cana-de-açúcar.....	22
3.2.2 Esterilização do mosto.....	23
3.3 Processo fermentativo.....	24
3.3.1 Tratamento ácido das células de levedura.....	26
3.4 Fatores que afetam a fermentação.....	27
3.4.1 Contaminação microbiana no processo fermentativo.....	28
3.5 Fermentação com mosto contendo alta concentração de açúcar.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Microrganismo e reativação das células.....	33
4.2 Propagação da Levedura.....	33
4.2.1 Preparo do pré-inóculo (meio líquido YPD).....	33
4.2.2 Propagação das células de levedura em Melaço 8ºBrix (M8) e Melaço 15ºBrix (M15).....	33
4.3 Estudos do comportamento da levedura <i>S. cerevisiae</i> CAT-1.....	34
4.3.1 Cinética em mosto contendo Melaço 8ºBrix ou 15ºBrix.....	34
4.3.2 Teste de fermentação em mosto M30 (Melaço 30ºBrix).....	35
4.4 Fermentação de melaço por <i>S. cerevisiae</i> linhagem CAT-1 em diferentes condições.....	35
4.4.1 Esterilização do mosto.....	36
4.4.2 Tratamento Ácido.....	36
4.5 Análises microbiológicas e físico-químicas.....	37
4.5.1 Densidade óptica (D.O.).....	37
4.5.2 Número de células viáveis e viabilidade celular.....	37
4.5.3 Consumo de substrato – AR e ART.....	37

4.5.4 Desprendimento de CO ₂	38
4.5.5 Análise da presença de contaminantes bacterianos.....	38
4.5.6 Determinação do pH.....	38
4.5.7 Determinação da Acidez.....	38
4.5.8 Teor Alcoólico.....	39
4.6 Cálculo dos parâmetros fermentativos.....	39
4.6.1 Sacarose utilizada para crescimento celular e para formação de produto.....	40
4.6.2 Velocidade específica de crescimento microbiano.....	41
4.7 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Caracterização do melaço.....	43
5.2 Estudos cinéticos da linhagem CAT-1 em mosto contendo Melaço 8ºBrix (M8) e Melaço 15ºBrix (M15).....	43
5.3 Cinética de fermentação da linhagem CAT-1 em mosto de alta concentração (M30).....	49
5.4 Fermentação da linhagem CAT-1 com e sem reciclo de células em mosto com alta concentração de açúcares.....	52
5.4.1 Parâmetros de crescimento da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos.....	53
5.4.2 Consumo de substrato – AR e ART.....	55
5.4.3 Valores de pH e acidez total.....	56
5.4.4 Desprendimento de CO ₂	58
5.4.5 Parâmetros fermentativos.....	59
5.4.6 Presença de contaminantes nos mostos e influência dos contaminantes na produção de etanol.....	61
5.5 Comparação entre os tratamentos com e sem esterilização e com e sem tratamento ácido das células de levedura.....	64
5.5.1 Teor alcoólico.....	64
5.5.2 Análise estatística para teor alcoólico, produtividade e rendimento.....	65
5.5.3 Produção de etanol em mosto composto com alta concentração de açúcar.....	69
5.6 Determinação da sacarose utilizada para crescimento celular (Sacarose Respirada) e para formação de produto (Sacarose Fermentada).....	70
5.7 Relação entre sacarose respirada e fermentada, produção de etanol e ARRT encontrado em cada tratamento.....	72
6 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO.....	81

RESUMO

Fermentação alcoólica de melaço com alta concentração de açúcar: efeito da esterilização do mosto e tratamento ácido da levedura

O processo industrial mais utilizado no Brasil para obtenção de etanol é o Melle-Boinot modificado, no qual as células de levedura são recicladas e submetidas a tratamento ácido entre os ciclos de fermentação; o mosto pode ser caldo de cana ou melaço diluído, subproduto da produção de açúcar, ou ainda, uma mistura de ambos. O estudo visa avaliar o efeito do processo de esterilização do mosto e tratamento ácido do creme de levedura, utilizando mosto com alta concentração de substrato; a linhagem CAT-1 foi submetida a quatro tratamentos fermentativos utilizando melaço de cana-de-açúcar diluído a 26°Bx, em cinco ciclos consecutivos. Os tratamentos foram: mosto não estéril e sem tratamento ácido das células de levedura (M1), mosto estéril e sem tratamento ácido (M2), mosto não estéril e com tratamento ácido das células de levedura (M1A) e mosto estéril e com tratamento ácido (M2A). Os parâmetros fermentativos analisados foram consumo de açúcar, desprendimento de CO₂, teor alcoólico, acidez total e análises microbiológicas. A produção de etanol nos quatro tratamentos de fermentação a partir de melaço com alta concentração de substrato foi, em média, de 12,2% (v/v) de etanol. As análises estatísticas do teor de etanol e produtividade analisadas por delineamento em blocos casualizados, em fatorial 2x2, indicaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de $\alpha=0,05$ de significância. Portanto, os resultados obtidos indicam que o tratamento ácido das células de levedura antes de cada ciclo e o processo de esterilização do mosto não afetam a produção de etanol. Apesar de ser esperado 15% (v/v) de etanol, ainda assim, foi um resultado satisfatório, levando em conta que o mosto continha apenas melaço sem suplementação ou qualquer outro tipo de tratamento.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*, CAT-1, Etanol, Reciclo de células

ABSTRACT

Alcoholic fermentation of molasses with high sugar concentration: effect of wort sterilization and yeast acid treatment

The most used industrial process in Brazil to obtain ethanol is the modified Melle-Boinot, in which yeast cells are recycled and subjected to acid treatment between fermentation cycles; the must may be sugarcane juice or diluted molasses, a byproduct of sugar production, or a mixture of both. To evaluate the effect of the must sterilization process and acid treatment of yeast cream, using must with high substrate concentration; the CAT-1 strain was subjected to four fermentative treatments using sugarcane molasses diluted at 26°Bx in five consecutive cycles. The treatments were: non-sterile must and without acid treatment of yeast cells (M1), sterile must and without acid treatment (M2), non-sterile must and with acid treatment of yeast cells (M1A) and sterile must with acid treatment (M2A). The fermentative parameters analyzed were sugar consumption, CO₂ detachment, alcohol content, total acidity and microbiological analyzes. Ethanol production in the four fermentation treatments from molasses with a high concentration substrate was, on average, 12.2% (v/v) of ethanol. Statistical analyzes of ethanol content and productivity by randomized block design (DBC), in a 2x2 factorial, indicated that there was no significant difference between treatments at the level of $\alpha = 0.05$ of significance. Therefore, the results obtained indicate that the acid treatment of the yeast cells before each cycle and the must sterilization process do not affect the ethanol production. Although 15% (v/v) of ethanol was expected, it was still a satisfactory result, taking into account that the must contained only molasses without supplementation or any other treatment.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, CAT-1 strain, Ethanol, Cell recycling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caminho metabólico da glicose na glicólise	19
Figura 2. Via metabólica da glicose na levedura <i>S. cerevisiae</i>	21
Figura 3. Esquema de condução dos estudos de fermentação de células de <i>S. cerevisiae</i> linhagem CAT-1.....	34
Figura 4. (1) Densidade ótica - D.O.; (2) número de células viáveis; (3) viabilidade celular e (4) Açúcar Redutor (AR) e Açúcar Redutor Total (ART) obtidos durante cultivo da linhagem CAT-1 em Melaço 8°Brix (M8) (A) e Melaço 15°Brix (M15) (B) a 30°C	45
Figura 5. Gráfico para determinação $\mu_{\text{máx}}$ da linhagem CAT-1 em meio M8 e meio M15.....	48
Figura 6. Densidade ótica – D.O (1), Número de células viáveis/mL (2), Viabilidade % (3) e Concentração de substrato – AR e ART (4) obtidos durante cultivo da linhagem CAT-1 em mosto M30, contendo melaço 30°Brix a 30°C.....	50
Figura 7. Açúcar Residual ao final de cada ciclo de fermentação da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos: M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura.....	56
Figura 8. pH inicial do mosto e final do vinho (sup) e Acidez total inicial e final presente no mosto de cada ciclo de fermentação da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos	57
Figura 9. Desprendimento de CO ₂ (g/L) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em cada ciclo de fermentação, nos diferentes tratamentos.....	59
Figura 10. Box-plot do teor alcoólico (g/L) durante fermentação da linhagem CAT-1 em diferentes tratamentos	64
Figura 11. Médias de Etanol (g/L e %), RP (%) e PF (g.(L.h) ⁻¹) dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento	66
Figura 12. Variação dos valores de Teor alcoólico dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento.	67
Figura 13. Variação dos valores Produtividade e Rendimento dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições dos tratamentos fermentativos.....	36
Tabela 2. Caracterização do melaço.....	43
Tabela 3. Densidade ótica (D.O.), Número de cél. viável/mL e Viabilidade celular durante fermentação da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos em cada ciclo de 24h de fermentação.....	54
Tabela 4. Açúcar Redutor Residual (ARR) e Açúcar Redutor Residual Total (ARRT) dos tratamentos em cada ciclo de fermentação.....	55
Tabela 5. Teor alcoólico obtido ao final de cada ciclo fermentativo pela linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos.....	59
Tabela 6. Rendimento e produtividade obtidos para cada ciclo fermentativo pela linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos.....	60
Tabela 7. Identificação da presença de contaminantes nos mostos estudados, ao final de cada ciclo de fermentação	62
Tabela 8. Médias dos parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1	65
Tabela 9. Médias da Sacarose Fermentada e Respirada dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento.....	71

1. INTRODUÇÃO

A produção industrial de álcool etílico, também conhecido como etanol, a partir da cana-de-açúcar, iniciou no Brasil no final do século XIX; antes disso, o processo de fermentação da cana-de-açúcar era apenas os das bebidas destiladas (AMORIM, 2011). Desde então, a produção de etanol, juntamente com o seu consumo, vem aumentando dia a dia.

O Brasil é um dos principais países produtores de etanol do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos. Cerca de 90% de etanol ofertado vem desses dois países, sendo que São Paulo é considerado um dos 10 estados que mais produzem etanol, estando em primeiro lugar (COMUNICAÇÃO LATIN AMERICANA, 2016; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR - UNICA, 2019).

Devido ao etanol apresentar baixo custo de produção e eficiência, assim como vantagens quanto a sustentabilidade, a tendência é aumentar e otimizar a produção desse combustível no Brasil. Porém, a otimização do processo não é tão fácil como pode parecer.

O processo industrial de fermentação alcoólica é um processo de grande estresse para as células de levedura devido, principalmente, ao reciclo das células, ao tratamento ácido e contaminações. Com isso, tentar otimizar o processo com mostos a base de subprodutos (como o melaço) e com maior concentração de substrato, por exemplo, pode tornar a levedura menos susceptível as condições de fermentação, em consequência ao aumento desse estresse. Porém, nessas condições, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mais resistentes a situações de estresse, seriam uma estratégia para aumentar a produção de etanol, visto que se torna cada vez mais interessante condições de fermentação com altos teores de açúcares fermentescíveis (PEREIRA et al., 2011).

As leveduras utilizadas nas indústrias alcooleiras tendem a ser mais resistente do que as de laboratório (PEREIRA et al., 2011). Algumas das linhagens mais estudadas e utilizadas industrialmente são: Pedra-2 (PE-2), Catanduva-1 (CAT-1) e Barra Grande-1 (BG-1) (MOREIRA et al., 2015), porém muitas outras linhagens já estão sendo estudadas e apresentando resultados satisfatórios quanto a produção de etanol em situações de maior estresse.

Processos de fermentação conduzidos com mosto contendo alta concentração de substrato, também denominados de Very High Gravity - VHG, são aqueles que utilizam mostos contendo acima de 25°Brix (teor de sólidos solúveis), com o objetivo de produzir níveis de etanol acima de 15% (v/v), ou seja, 120 g/L (CASEY et al., 1984; FRANCISCHETTI, 2017; LI et al., 2009), enquanto uma fermentação tradicional utiliza entre 18-22°Brix de açúcar (BREXÓ et al., 2017; CASTRO, 2013).

As fermentações, a partir de mosto com alta concentração de açúcares, tem o intuito de produzir mais etanol em menos tempo com o mesmo volume de mosto de fermentação e sem aumentar os custos e reduzir viabilidade celular (MONTEIRO et al., 2018).

No Brasil o processo de fermentação mais utilizado pelas indústrias é o descontínuo alimentado, também denominado de Melle-Boinot. Esse processo utiliza o reciclo das células de levedura após tratamento ácido das células para o próximo ciclo de fermentação (AMORIM et al., 2011).

O reciclo sucessivo das células de levedura todos os dias dentro das usinas e as dificuldades para esterilizar grandes volumes de mosto permitem que microrganismos contaminantes entrem no processo, competindo com as cepas de levedura selecionadas (AMORIM et al., 2011; LIMA et al., 2001).

Uma das vantagens de se trabalhar com o VHG, é que as altas concentrações de açúcar promovem altas concentrações de etanol reduzindo a taxa de desenvolvimento bacteriano, diminuindo assim, o uso de meios para controle de contaminação, como o tratamento ácido e o uso de antibióticos. Por outro lado, essa alta concentração de etanol, assim como o tratamento ácido, pode reduzir a viabilidade da levedura (ALEXANDRE et al., 2001; CERQUEIRA, 2013).

Menezes (1980) observou que o tratamento ácido é capaz de controlar as contaminações e, também, pode auxiliar em um maior rendimento fermentativo, porém, apesar de ainda haver poucos estudos em torno desse assunto, outros artigos mostram que esse procedimento pode reduzir a viabilidade celular provocando uma queda no rendimento de fermentação (DELLA-BIANCA et al., 2014; NAGASHIMA, 1990 apud MELO, 2006), assim como, pode não ser suficiente para o controle de contaminantes provenientes da fermentação (BASSI et al., 2013).

A implantação de fermentação a partir de mosto mais concentrado ainda é limitada nas indústrias brasileiras, pois apesar das vantagens, ainda faltam mais

estudos do comportamento das linhagens de *S. cerevisiae* nesse tipo de cenário (AMORIM et al., 2011; DELLIAS et al., 2018; FRANCISCHETTI, 2017) e os poucos estudos a respeito desse assunto, não abrangem o mosto sem nenhum tipo de complementação e sem tratamento térmico, que é mais próximo da real situação das indústrias produtoras de etanol no Brasil.

Neste contexto, observou-se a importância de compreender o comportamento da levedura em condições semelhantes da fermentação industrial brasileira, porém em pequena escala, utilizando mosto com alta concentração de substrato, a partir do melaço, um subproduto de baixo custo da fabricação do açúcar (COSTA et al., 2012), buscando a otimização do processo.

Por tanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1 em processo fermentativo de mosto contendo melaço com alta concentração de açúcares, diluído em água sem suplementação. E, neste cenário, avaliar a influência do tratamento térmico do mosto e do tratamento ácido do creme de levedura ao longo de cinco ciclos fermentativos com reciclo de células.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do processo de esterilização do mosto e tratamento ácido do creme de levedura durante cinco ciclos consecutivos de fermentação alcoólica de mosto contendo melaço em alta concentração de substrato, 26°Brix.

2.2 Específico

Avaliar o perfil fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1 no processo de fermentação alcoólica, utilizando mosto contendo melaço com altas concentrações de açúcares, em ciclos consecutivos, nas condições:

- Mosto submetido ou não ao processo de esterilização;
- Creme de levedura com e sem tratamento ácido das células entre cada ciclo fermentativo.

Com este estudo, espera-se constatar:

- O efeito do melaço puro, apenas diluído, como mosto de fermentação;
- O efeito da falta do processo de esterilização dos mostos de fermentação quanto a produção de etanol e como os contaminantes naturalmente presentes podem afetar a fermentação;
- O efeito dos reciclos de células nos processos de produção de etanol, juntamente com o tratamento ácido do creme de levedura empregado pelas usinas e o quanto isso pode afetar a viabilidade celular;
- E por fim, o efeito de mostos com altas concentrações de substrato na produção de etanol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agentes da fermentação

O microrganismo utilizado para a fermentação alcoólica é a levedura, organismo unicelular do reino dos Fungos, que se reproduz por gemação ou brotamento (AZHAR et al., 2017).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais utilizada para a fermentação alcoólica, visto que este microrganismo é capaz de fermentar a glicose, frutose e sacarose que são os açúcares presentes na cana-de-açúcar. Pedra-2 (PE-2), Catanduva-1 (CAT-1) e Barra Grande-1 (BG-1) são as linhagens de levedura mais utilizadas pelas usinas do Brasil (MOREIRA et al., 2015), apesar de outras linhagens já estarem sendo utilizadas.

Esse microrganismo tem característica facultativa sobre a utilização do oxigênio, sendo capaz de metabolizar tanto em aerobiose (presença de oxigênio) quanto em anaerobiose (ausência de oxigênio) (NAVES et al., 2010). Independente da presença ou ausência de oxigênio, a molécula de glicose é transformada em duas moléculas de piruvato, em uma sequência de reações, denominada de via glicolítica, como observado na Figura 1.

Figura 1. Caminho metabólico da glicose na glicólise

Fonte: Elaborado pela autora a partir de Crocomo et al. (2001)

Primeiramente ocorre a fosforilação do açúcar, tendo como produto a frutose-1,6-difosfato. Com a ação da enzima aldolase ocorrerá o desdobramento desse açúcar fosforilado em Di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Essas duas moléculas serão sintetizadas, a partir da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fosfoglicerato quinase, em duas moléculas de 3-fosfoglicerato que será oxidado em duas moléculas de 2-fosfoglicerato para então ocorrer a formação do piruvato (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001; RODRIGUES et al., 2005).

O piruvato é o produto final da glicólise, portanto, na fase de formação do piruvato, ocorrerá a remoção de uma molécula de água da 2-fosfoglicerato catalisada pela enzima enolase, no qual haverá a produção de duas moléculas de fosfoenolpiruvato. Finalmente, o fosfoenolpiruvato transferirá seu grupo fosfato para o ADP, através da enzima piruvato quinase, gerando duas moléculas de piruvato e duas de ATP (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001; RODRIGUES et al., 2005).

A levedura tem como objetivo produzir energia (na forma de ATP – Trifosfato de adenosina) para sua sobrevivência, por tanto, a fermentação alcoólica é uma via de produção de energia para sobreviver na ausência de oxigênio, sendo necessário transformar muito açúcar em álcool para suprir suas necessidades energéticas. Como apresentado na Figura 2, a *S. cerevisiae*, quando em aerobiose, sua via metabólica prioriza a produção de energia onde ocorrem respiração e crescimento de biomassa, porém quando em anaerobiose, sua via metabólica prioriza a fermentação para conseguir produzir energia e, conseqüentemente, produz etanol (PELCZAR JR et al., 1996).

Figura 2. Via metabólica da glicose na levedura *S. cerevisiae*.

Fonte: Elaborado pela autora a partir de Crocomo et al. (2001) e Klassa (2019)¹

Na respiração (metabolismo aeróbio) a molécula de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) é oxidada na presença do oxigênio (O₂) gerando gás carbônico (CO₂) e água (H₂O), como apresentado, estequiometricamente, na Equação 1. Porém, na fermentação alcoólica (metabolismo anaeróbio) a molécula de sacarose é oxidada na ausência de O₂, gerando etanol (C₂H₅OH) e CO₂, como apresentado, estequiometricamente, na Equação 2. A partir dessas equações é possível verificar o quanto do açúcar foi utilizado pela via anaeróbia (sacarose fermentada) e o quanto foi utilizado pela via aeróbia (sacarose respirada) (LEHNINGER, 2002; VENTURINI-FILHO et. al., 2013).

¹ KLASSA, B. In. <https://blog.estrategiavestibulares.com.br/fermentacao/>

3.2 Mosto de fermentação

A produção de etanol no Brasil, por fermentação, utiliza como mosto o caldo de cana clarificado ou melaço diluído ou até mesmo um mix de ambos. O caldo de cana clarificado é um líquido açucarado, obtido da cana-de-açúcar por difusor ou moenda, enquanto o melaço é um líquido viscoso rico em açúcares (COSTA et al., 2012).

3.2.1 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço, ou mel final, é um dos principais subprodutos da produção de açúcar, obtido após a cristalização e centrifugação do açúcar. Esse subproduto da indústria açucareira é produzido na proporção de 25-40 L por tonelada de cana processada, podendo chegar até 60 L por tonelada de cana processada (COSTA et al., 2012; LIMA et al., 2001). O mesmo vem sendo utilizado cada vez mais na indústria alcooleira por ser considerado uma fonte de carbono de baixo custo (TECLU et al., 2009).

A composição do melaço de cana-de-açúcar pode apresentar um teor de 17 a 25% de água, 45 a 50% de açúcares totais, 2,5% de polissacarídeos (dextranos, pentosanos), 2,5 a 4,5% de peptídeos e aminoácidos livres e 7 a 15% de cinzas (óxido de potássio, óxido de cálcio, óxido de magnésio, óxido de sódio, óxido férrico, dióxido de silício, dióxido de enxofre, cloro, pentóxido de fosforo) (CLARKE et al., 2012). Porém, a qualidade, composição e quantificações do melaço podem ser alteradas de acordo com a matéria prima (cana-de-açúcar), região de plantio e processo de fabricação do açúcar (COSTA et al., 2012).

O melaço em sua forma pura, por ser um líquido com altas concentrações de açúcares, não é um meio favorável para fermentação, portanto, é necessário que o mesmo seja submetido a um processo de diluição, formando assim um líquido açucarado com cerca de 20°Brix, capaz de fermentar, denominado mosto (CASTRO, 2013). Para os mostos provenientes de melaço, geralmente, é realizada apenas uma

diluição com água, em casos especiais são adicionados fosfatos e sais de amônio, na proporção de 1g /L de mosto (LIMA et al., 2001).

De acordo com Liu et al. (2008) o melaço contém, geralmente, a maioria dos nutrientes essenciais para o microrganismo, porém mesmo diluído e sendo predominante em sua composição a sacarose, o melaço contém íon metálicos como cálcio, sódio, ferro, cobre, alumínio, entre outros que, dependendo da concentração, podem ser tóxicos e com isso inibir o crescimento celular da levedura.

Processos de produção de etanol que utilizam o mix de caldo de cana e melaço entre 18–22°Brix podem obter de 8-12% (v/v) de etanol (AMORIM et al., 2011; BREXÓ et al., 2017; CASTRO, 2013).

Gutierrez et al. (1991) em seu ensaio de fermentação com 15% de ART obteve 7,8% (v/v) de etanol, ou seja, cerca de 62g/L, a partir de mosto composto por melaço de cana-de-açúcar enriquecido. Tosetto (2002) utilizou melaço (com pureza variando de 46 a 65%) proveniente de 10 unidades industriais dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás; a fermentação desses melaços, apenas com diluição para 200g/L de açúcares redutores totais, produziu de 72 a 88 g/L de etanol, essa variação ocorreu devido a composição dos melaços.

3.2.2 Esterilização do mosto

O tratamento do melaço para ser utilizado como mosto de fermentação consiste em diluição do melaço até obtenção do °Brix desejado, aquecimento ou esterilização e, por fim, decantação (TOSETTO, 2002).

No Brasil não é feito a esterilização do mosto de fermentação nas usinas, deixando um caminho aberto para os contaminantes, podendo prejudicar a fermentação (LIMA et al., 2001). O tratamento térmico não ocorre pois é inviável para a indústria de produção de etanol esterilizar grandes quantidades de mosto, assim como as dornas de alto volume (AMORIM et al., 2011).

O número de leveduras contaminantes em mosto, no processo de fermentação, pode ser de 10^4 a 10^5 em caldo de cana e 10^1 a 10^2 em melaço de cana-de-açúcar (SILVA-FILHO et al., 2005). Bonatelli et al. (2019) afirma que os contaminantes presentes em mosto de cana-de-açúcar não estéril podem atingir até 10^3 (leveduras selvagens) e 10^8 (bactérias).

A fermentação de mosto contendo caldo-de-cana estéril e não estéril em 3 ciclos fermentativos, com reciclo de células foi avaliada por Bonatelli et al. (2019). Os

parâmetros fermentativos avaliados indicam que o rendimento de etanol foi maior nas fermentações com mosto não estéril, porém a produtividade foi maior em mosto estéril; a viabilidade das células de levedura se manteve alta, de 88% a 91%, em ambos os tratamentos. Ao final os autores concluíram que a falta de esterilização não foi capaz de afetar a fermentação e sugerem que talvez seja necessários mais ciclos para que haja algum efeito significativo na fermentação.

Amostras de mel final tratado (MT) e não tratado (MNT) utilizadas por Tosetto (2002) para realizar testes de fermentação, indicou que a produtividade do MNT foi de 13,2% maior que no MT, porém o rendimento em etanol foi superior em MT. O autor também constatou nas características do melaço uma queda do açúcar redutor total de 27,7 g para cada 100 kg de mel tratado, porém um aumento da pureza de pouco mais de 1% do MT em relação ao MNT. Ao final, o autor concluiu que o tratamento do melaço, apesar de ser capaz de aumentar sua pureza, não causou efeito na melhoria da qualidade fermentativa.

3.3 Processo fermentativo

O processo industrial de fermentação alcoólica ocorre nas dornas; pré-fermentação inicia com a adição do mosto nas dornas que já contem a levedura (pé de cuba), ocorrendo a multiplicação das células da levedura e um lento aumento da temperatura do meio. Após, aproximadamente, 5 horas do início desse processo, começa a fermentação principal, que pode ser identificada pelo aparecimento de produção de espuma, elevação rápida de temperatura, menos densidade do mosto, pH baixo e formação de etanol. Esse processo tem duração aproximada de 9 horas, finalizando com o início do desaparecimento da espuma, dando início a pós-fermentação, onde ocorre a diminuição da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e nenhuma formação de espumas; essa fase dura cerca de 7 horas (CECCATO-ANTONINI, 2004).

O mosto fermentado, denominado vinho, passa por um processo de centrifugação, separando a massa de levedura (creme de levedura) do vinho, sendo que a massa de levedura, em casos de reciclo de célula, é submetido ao tratamento ácido e retorna à dorna de fermentação para o próximo ciclo (RAGHAVENDRAN et al., 2017) e o vinho é destinado as colunas de destilação para a obtenção do álcool etílico.

O processo de fermentação alcoólica pode ser conduzido das seguintes formas: (1) descontínua, no qual o fermentador é preenchido completamente, e ao final da fermentação, o mosto fermentado é retirado para iniciar um novo processo de fermentação na dorna; (2) descontínua alimentada, no qual o mosto é adicionado em um fluxo constante ou pode variar com o tempo, no entanto, nada é retirado e o produto permanece no fermentador até o final da fermentação; (3) contínua, no qual o volume do fermentador se mantém constante, com entrada de mosto e saída de produto fermentado proporcionalmente, podendo ser operado por longos períodos de tempo; (4) semi-contínua, no qual uma parte do mosto fermentado é retirada do fermentador e o que permanece no fermentador será utilizado como inóculo para o próximo abastecimento de mosto, havendo a fermentação completa novamente, para então o processo se repetir (CARVALHO; SATO, 2001; SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

No Brasil, o processo de fermentação mais utilizado pelas indústrias é o descontínuo alimentado, em 85% dos processos industriais, também denominado de Melle-Boinot. Esse processo consiste principalmente na fermentação com a alimentação do mosto de forma constante ou em parcelas, na reciclagem das células de levedura para os próximos ciclos de fermentação e tratamento ácido das células recicladas (AMORIM et al., 2011).

Estudos da adição do mosto nas dornas de fermentação de diferentes formas (constante, em parcelas e de uma única vez) sugerem que o mosto, quando adicionado de uma única vez, pode ocasionar aumento rápido de temperatura (até 17°C), maiores concentrações residuais de açúcares e maior formação de glicerol; porém, quando adicionado de forma constante ou em parcelas não ocorre um aumento significativo no estresse osmótico (RAGHAVENDRAN et al., 2017).

O reciclo das células de levedura pode chegar a ser praticado em torno de 400 vezes na indústria. Para que isso ocorra, sem que haja perdas significativas na viabilidade da levedura, é necessário: linhagens mais resistentes, que além de produzirem bons rendimentos de etanol, reservem uma quantidade adequada de carboidratos para construção dessa biomassa resistente, garantindo a viabilidade das células de levedura durante vários reciclos, permitindo que as células persistam no processo fermentativo por muitos ciclos (RAGHAVENDRAN et al., 2017).

3.3.1 Tratamento ácido das células de levedura

O creme de levedura, obtido pela centrifugação do vinho, que está concentrado a cerca de 60%, passa por um tratamento ácido, no qual é diluído em água (cerca de 2 vezes o volume do creme) e regulado o pH em aproximadamente 2,5 com adição de ácido sulfúrico para efeito desfloculante e controle de contaminação, podendo ser incubado por um período de 1 a 3 horas. Após o tratamento, o creme de leveduras, é utilizado para iniciar um novo processo fermentativo (AMORIM et al., 2011; CECCATO-ANTONINI, 2018; GOMES, 1988).

O sistema de reaproveitamento de células juntamente com o tratamento ácido possibilita uma redução do tempo de fermentação, assim como, um menor consumo de substrato para crescimento celular, sendo, o mosto, quase todo metabolizado para produção de etanol (MENEZES, 1980).

Apesar de alguns trabalhos dizerem que o tratamento ácido além de controlar as contaminações também auxilia em um maior rendimento fermentativo, outros dizem que esse procedimento pode reduzir a viabilidade celular provocando uma queda no rendimento de fermentação (NAGASHIMA, 1990 apud MELO, 2006).

Em pesquisa desenvolvida por Bassi et al. (2013), os autores esperavam realizar o tratamento ácido em ciclos fermentativos consecutivos sem interferir na viabilidade da levedura *S. cerevisiae* e eliminar os contaminantes; porém foi observado que apesar da levedura ter suportado valores de pH baixo como 1,5, o contaminante apresentou a mesma resistência, não sendo tão eficiente como o esperado.

Estudos realizados por Della-Bianca et al. (2014) com a levedura PE-2, utilizando tratamento ácido das células de levedura em sua fase ativa (onde o meio de encontra com valor elevado de substrato e levedura em sua capacidade máxima) e estacionária (meio empobrecido de glicose, iniciando a fase de declínio) em condições de pH 1,5 por um período de 4h. Após os tratamentos os autores constataram um declínio significativo da viabilidade celular em ambas as fases, porém na fase exponencial a levedura apresentou uma perda de 80% da sua viabilidade enquanto que na fase estacionaria (na qual o tratamento ácido nas indústrias é realizado após essa fase) a levedura apresentou uma perda de 35%. Ao final, os autores concluíram que parece relevante investigar e otimizar cepas mais tolerantes ao tratamento ácido.

O tratamento ácido das células pode ser ocasionalmente, ineficiente, além disso, os ácidos corrosivos podem apresentar um sério risco de segurança aos manipuladores; assim como a disposição final desse efluente pode elevar consideravelmente os custos da produção de etanol (CECCATO-ANTONINI, 2018).

No entanto, o tratamento ácido entre os ciclos pode proporcionar uma diminuição de até três ciclos log para as bactérias contaminantes (CECCATO-ANTONINI, 2020, informação pessoal).

3.4 Fatores que afetam a fermentação

O processo de fermentação pode sofrer com certos fatores que poderão alterar o produto final; os fatores que afetam a fermentação (DE SOUSA et al., 2011; NAVES et al., 2010; REIS, 2011) , são:

- pH: O pH influencia no controle de contaminação microbiana, crescimento das leveduras, taxa de fermentação e formação de subprodutos. O pH ideal para o desenvolvimento da fermentação é entre 4 e 5.
- Temperatura: A temperatura influencia no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são mesófilas, tendo uma fermentação ótima na faixa de 26 a 38°C.
- Concentração de açúcar: Com elevada concentração de açúcares ocorre uma repressão do gene que codifica a invertase (enzima capaz de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose), fazendo com que a levedura consuma primeiro a glicose presente no meio, baixando a concentração do mesmo. Com isso a enzima passa a ser produzida e a hidrólise de sacarose e metabolização de glicose vai ocorrendo simultaneamente. O aumento da concentração pode levar a um estresse da levedura ocasionando redução de crescimento e perda da viabilidade das celular (DARIO, 2012).
- Concentração do inóculo: Com uma elevada concentração de fermento ocorre um aumento da velocidade de fermentação, juntamente com aumento de temperatura do mosto, auxiliando no controle de bactérias indesejáveis, porém um elevado teor de levedura exige maior consumo de açúcar, resultando em uma competição pelos nutrientes do meio, diminuindo a viabilidade das células.

- Oxigênio: Grandes concentrações de oxigênio provoca a inibição da fermentação alcoólica e uma taxa maior de crescimento microbiano, esse efeito está associado ao estado fisiológico da célula, se manifestando nas leveduras em fase estacionária.
- Concentração de etanol: Os fatores que influenciaram na sensibilidade da levedura ao etanol são a temperatura, a aeração e a composição do meio. A concentração elevada de etanol pode retardar o crescimento da levedura, reduzir a viabilidade celular e a habilidade fermentativa. O crescimento celular não é inibido em concentrações de álcool inferiores a 26 g/L, porém pode ser inibido totalmente em concentração de 68,5 g/L.
- Viabilidade celular: quanto maior o número de células viáveis melhor será o desempenho do processo de fermentação. Com o aumento da temperatura, ocorre um aumento na taxa de produção e um acúmulo de álcool no meio e nas células, diminuindo assim, a viabilidade das células estacionária.
- Floculação: Floculação é quando as células de levedura se juntam, formando aglomerados, sedimentando-se rapidamente, isso faz com que comprometa a conversão de açúcar em álcool e CO₂, por reduzir o contato direto da célula com o meio, já que as mesmas estão agrupadas. A floculação pode ocorrer pelo contato da célula de levedura com gomas produzidas por bactérias contaminantes ou até mesmo por contato com as próprias bactérias e leveduras contaminantes.
- Presença de contaminação microbiana: as altas temperaturas favorecem a contaminação microbiana, sendo identificada principalmente pelo aumento da produção de ácido láctico, onde os principais contaminantes são os *Bacillus* e os *Lactobacillus*. Um processo de fermentação sadio apresenta níveis de bactérias de 10⁵ células/mL.

3.4.1 Contaminação microbiana no processo fermentativo

A contaminação microbiana no processo de fermentação é um fator muito importante a ser considerado, pois além do contaminante desviar sacarose para produção de outros produtos não desejados, como ácido acético e láctico, também pode consumir parte do etanol e ocasionar a floculação, reduzindo ainda mais o rendimento da fermentação (NOBRE et al., 2007).

Entre os problemas encontrados na fermentação alcoólica podem ser mencionadas as fermentações indesejáveis, como a fermentação láctica, que ocorre principalmente pela contaminação por *Lactobacillus*, do grupo das bactérias lácticas que são bactérias acidófilas tolerantes a pHs mais baixos, entre 5,5 a 6,2, mas podendo crescer em pH menores que 5 (COSTA et al., 2008).

Em pesquisa, isolando bactéria de mosto e dornas de fermentação alcoólica, os autores verificaram que 98% eram bactérias Gram-positivas, onde o gênero predominante foi o *Lactobacillus* com cerca de 60%; das espécies de *Lactobacillus* isoladas o *Lactobacillus fermentum* representou cerca de 15% (GALLO, 1992 apud SOUSA, 2005).

Apesar dos inúmeros problemas causados pela contaminação de *L. fermentum* na fermentação, Sousa (2005) avaliando a interação da *S. cerevisiae* com o *L. fermentum* no processo fermentativo da cachaça artesanal, concluiu que o *L. fermentum* não competiu com a levedura pelo açúcar e não houve inibição de crescimento dessa levedura, assim como a levedura reprimiu o crescimento da bactéria após 12 horas de fermentação. Alcarde et al. (2007) avaliando a viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* juntamente com os contaminantes *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *L. plantarum* observaram que a viabilidade da levedura teve maior redução com *B. subtilis*, reduzindo para 59,2% e com *L. fermentum*, reduzindo para 73,5%.

As bactérias e as células de levedura competem pelos nutrientes. Estudos de interação entre as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) e as leveduras demonstram que o efeito das LAB, no processo de fermentação, vai além da produção de ácido, e as interações entre bactérias e leveduras não devem ser negligenciadas (CECCATO-ANTONINI, 2018).

Os contaminantes também são responsáveis por causar floculação das células de leveduras, prejudicando a fermentação por depositar flocos de levedura no fundo dos tanques de fermentação não permitindo uma fermentação completa. Por consequência, deixando açúcares residuais e prejudicando a centrifugação do reciclo de células, já que o centrifugado terá mais vinho (mosto fermentado), fazendo com que o tratamento ácido necessite de mais adição de ácido sulfúrico para atingir seu pH ideal. Porém com o aumento de ácido, ocorre o aumento do estresse das células de levedura, proporcionando uma diminuição da sua atividade ou até a morte (AMORIM et al., 2011).

Com base nisto, torna-se ainda mais interessante estudar a interação da levedura *S. cerevisiae* em mosto com e sem tratamento térmico, para verificar se haverá ou não uma queda no rendimento da fermentação.

3.5 Fermentação com mosto contendo alta concentração de açúcar

O processo de fermentação com mosto de alta concentração ou Very High Gravity fermentation technology refere-se a fermentações com altos teores de açúcares fermentescíveis, ou seja, mosto contendo acima de 25°Brix (CASEY et al., 1984; FRANCISCHETTI, 2017; LI et al., 2009), que tem como objetivo produzir níveis de etanol acima de 15% (v/v) ou 120 g/L (CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2014; MONTEIRO et al., 2018). As indústrias brasileiras atuam com fermentações com concentração de etanol em torno de 8,5% (v/v), em média (CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2014).

Com o mosto de alta concentração é possível melhorar a eficiência da fermentação em até 7%, produzindo mais etanol em menos tempo com a mesma quantidade de mosto, porém mais concentrado, assim como, reduzir problemas da fermentação como contaminantes e até mesmo tolerância a temperatura, por produzir altos teores de etanol, de acordo com a engenheira Celina Yamakawa (CTBE, 2014). Isso tudo favorece tanto o âmbito econômico quanto o energético e o ambiental (MONTEIRO et al., 2018).

Apesar das inúmeras vantagens ainda existe uma limitada tolerância, por parte das leveduras, a respeito da alta concentração de etanol no vinho (mosto fermentado), causando grande estresse as células de levedura. O etanol ataca a membrana citoplasmática das células de levedura, retardando seu crescimento, reduzindo viabilidade e diminuindo a habilidade fermentativa, terminando em uma fermentação incompleta (ALEXANDRE et al., 2001). Com o reciclo das células durante as fermentações, a condição de estresse é acentuada, sendo muito comum um ciclo fermentativo apresentar boas porcentagens de etanol, porém não tão boas nos ciclos seguintes, no entanto, se a fisiologia da levedura garantir sua vitalidade no final de cada fermentação é possível alcançar valores mais elevados de etanol (CERQUEIRA, 2013).

Outro problema com a fermentação de alta concentração de açúcar é a pressão osmótica, onde o líquido de um meio mais concentrado se desloca para um

menos concentrado através de uma membrana para obter seu equilíbrio, sendo assim, essa pressão tende a desestabilizar o equilíbrio da célula de levedura, por perda de água, causando altos estresses, levando a uma sensibilidade maior ao etanol e reduzindo sua viabilidade (MOREIRA et al., 2015).

Em estudos de Pereira et al. (2011) as linhagens PE-1, VR-1 e CAT-1, coletadas em destilarias de bioetanol, foram submetidas a fermentação com altos teores de açúcares (330g/L). Após a fermentação foi obtido teor de etanol (%) final de 19, 18,5 e 18; rendimento (%) de 90, 80-85 e 80 e produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de 2,5, 2,0-2,5 e 1,5-2,0 das linhagens PE-1, VR-1 e CAT-1, respectivamente.

Por outro lado, Monteiro et al. (2018) estudando a produção de etanol em condições de fermentação VHG com as linhagens CAT-1 e PE-2, constatou que o maior volume de produção de etanol para a CAT-1 foi em mosto 35°Brix e para PE-2 foi em mosto 25°Brix, porém o consumo de açúcar não foi coerente com o volume de etanol obtido, com melhor rendimento em 30°Brix para PE-2 e 25°Brix para CAT-1.

Em vista das inúmeras vantagens de se implementar a fermentação de mosto com alta concentração, torna-se cada vez mais importante pesquisas em torno de linhagens industriais mais resistentes para essas condições (PEREIRA et al., 2011). Porém, apesar de pesquisas como a de Pereira et al. (2011) trazer consigo resultados satisfatórios, as condições de estudo podem ser, na maioria das vezes, bem diferentes das utilizadas nas indústrias de produção de etanol brasileiras, sendo necessário mais estudos em condições mais semelhantes às fermentações realizadas na indústria brasileira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ-USP.

4.1 Microrganismo e reativação das células

As linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foram obtidas junto à LNF Latino Americana. As células liofilizadas foram reativadas em placas contendo meio YPDa (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; glicose, 20 g/L e ágar, 20 g/L) e armazenadas a 4°C.

As amostras de melaço foram gentilmente cedidas pela Usina Bom Retiro – Capivari/SP. O melaço foi diluído com água destilada, autoclavado, quando necessário, e congelado, sendo descongelado apenas antes do uso.

4.2 Propagação da Levedura

4.2.1 Preparo do pré-inóculo (meio líquido YPD)

Inicialmente foi realizada uma propagação das células em caldo YPD, no qual a levedura previamente crescida em YPDA a 30°C/24h (estufa FANEM – modelo 502) foi inoculada em caldo YPD e incubada em Shaker Mini incubadora Orbital (Modelo MA 410 – MARCONI), agitação de 160 rpm a 30°C por 24h. Em seguida, o meio foi centrifugado em Centrifuga Digital Refrigerada Microprocessada (CT5000R – CIENTEC) a 3372 g/10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas (1X) com solução salina (0,9%) e, a seguir, as células foram ressuspensas em 2 mL de sol. salina. Esse foi utilizado como pré-inóculo para o meio Melaço 8°Brix (M8).

4.2.2 Propagação das células de levedura em Melaço 8°Brix (M8) e Melaço 15°Brix (M15)

Um mililitro da suspensão de células foi inoculado em Erlenmeyer (250mL) contendo 100mL de melaço 8°Brix estéril (80g/L), o material foi incubado em Shaker a 160 rpm, 30°C por 12h, no qual a concentração de células inicial de M8 foi igual a 10^6 cél./mL. Após a incubação, o mosto M8 foi centrifugado a 3372 g/10min, lavado com sol. salina 0,9%, centrifugado novamente e ressuspensado em 50mL de salina 0,9%. Esse foi usado como inóculo para o meio Melaço 15°Brix (M15).

Para a propagação das células de levedura em mosto M15, foi inoculado 2mL da suspensão celular (obtida em mosto M8) em Erlenmeyer (500mL) contendo 200mL de melaço 15°Brix (150g/L) estéril (autoclavado em 121°C e 1 atm por 15min). O frasco foi incubado em Shaker a 160 rpm, 30°C por 24h (M15 = 10^6 cél./mL). Após a incubação, o mosto M15 foi centrifugado a 3372g/10min, lavado com sol. salina 0,9%, e ressuspendido em 50mL de salina 0,9%. Esse foi usado como inóculo para os tratamentos de fermentação.

Os experimentos foram conduzidos conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3. Esquema de condução dos estudos de fermentação de células de *S. cerevisiae* linhagem CAT-1

Fonte: elaborado pela autora

4.3 Estudos do comportamento da levedura *S. cerevisiae* CAT-1

4.3.1 Cinética em mosto contendo Melaço 8°Brix ou 15°Brix

Para melhor propagação das células de levedura, foi necessário conhecer a cinética de crescimento da linhagem CAT-1 em melaço 8°Brix e 15°Brix. Sendo assim, seguindo a metodologia descrita anteriormente em propagação das células em M8 e M15, durante o período de incubação foram sendo retiradas alíquotas nos tempos 0, 6, 8, 10, 12, 14 e 19 horas, para M8, e depois nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 horas, para M15. As amostras foram submetidas a análises de densidade óptica (D.O), viabilidade celular da levedura, açúcar redutor (AR) e açúcar redutor total (ART).

4.3.2 Teste de fermentação em mosto M30 (Melaço 30°Brix)

Antes de proceder com os tratamentos de fermentação com alto teor de açúcares fermentescível, com e sem processo de esterilização do mosto e com e sem tratamento ácido do creme de levedura, foi importante realizar um estudo prévio do comportamento da linhagem CAT-1 em fermentações com teor elevado de substrato, neste caso, 300g/L de ART. Com isso foi possível definir a concentração de mosto mais adequada para essa linhagem em fermentações com 5 ciclos consecutivos.

O teste de fermentação foi realizado em tubos de centrifuga (50 mL) com tampão de algodão, onde o Melaço a 40°Brix previamente esterilizado em autoclave, foi adicionado aos poucos no tubo até atingir 30°Brix e totalizar 25mL, seguindo o sistema reduzido de produção de etanol, descrito por Raghavendran et al. (2017), com modificações, da seguinte forma:

- T0 (0h de fermentação): 6,25mL do inóculo proveniente do mosto M15 + 6,25mL de melaço a 40°Brix estéril, totalizando 12,5mL de mosto e concentração de 20°Brix.
- T1 (1h de fermentação): Após 1h de fermentação, foi adicionado 6,25mL de melaço a 40°Brix estéril, totalizando 18,75mL e 26,7°Brix.
- T2 (2h de fermentação): Após 2h de fermentação, foi adicionado 6,25mL de melaço a 40°Brix estéril, totalizando 25mL e 30°Brix.

O ensaio de fermentação foi realizado em duplicata, com repetição.

Os tubos de fermentação, denominado M30 contendo 10^9 cél. viáveis/mL, foram incubados em estufa a 30°C por 24h. Amostras foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 horas para análise de D.O., Viabilidade celular da levedura, AR e ART.

4.4 Fermentação de melaço por *S. cerevisiae* linhagem CAT-1 em diferentes condições

Quatro tratamentos fermentativos foram realizados com 5 ciclos consecutivos de 24h cada, utilizando como mosto Melaço diluído a 26°Brix e como agente de fermentação a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1. O diferencial de cada fermentação foi a esterilização do mosto (estéril e não estéril) e o tratamento ácido do creme de levedura de um ciclo para outro (com e sem tratamento ácido). As condições de cada fermentação estão sintetizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições dos tratamentos fermentativos

Tratamento	Condições
M1	Mosto Não estéril + Sem tratamento ácido da levedura
M1A	Mosto Não estéril + Com tratamento ácido da levedura
M2	Mosto estéril + Sem tratamento ácido da levedura
M2A	Mosto estéril + Com tratamento ácido da levedura

Os quatro tratamentos de fermentação foram realizados em tubos de centrifuga de 50mL com tampão de algodão, onde o Melaço a 40°Brix com e sem tratamento térmico foi adicionado aos poucos em seus respectivos tubos até atingir 26°Brix e totalizar 25mL, como descrito anteriormente.

Cada um dos tubos de fermentação foi incubado em estufa a 30°/24h, no qual no início e no final da fermentação foram recolhidas alíquotas para análise de D.O, Viabilidade celular da levedura, AR, ART, teor alcoólico, perda de CO₂, pH, acidez e presença de contaminantes. Esses processos de fermentação foram repetidos 5 vezes com reciclo de célula com e sem tratamento ácido.

Os ensaios foram realizados com repetição.

4.4.1 Esterilização do mosto

A esterilização do mosto (M2 e M2A) foi realizado em Autoclave á 120°C / 1 atm por 15 min. Após esterilizado, o mosto foi armazenado sob congelamento, juntamente com o mosto sem esterilização (M1 e M1A), até o momento de uso.

4.4.2 Tratamento Ácido

Após centrifugação, o vinho deslevedurado seguiu para suas respectivas análises, enquanto o creme de levedura foi diluído, duas vezes o seu volume, com solução de ácido sulfúrico pH 2, incubado em shaker com agitação de 120 rpm, por 2h. Após o final das 2h, o creme de levedura tratado foi centrifugado e ressuspendido em 6,25 mL de solução salina para então iniciar o próximo ciclo. Esse procedimento foi realizado para as fermentações M1A e M2A.

4.5 Análises microbiológicas e físico-químicas

4.5.1 Densidade óptica (D.O.)

A biomassa das células de levedura presente nos diferentes estudos foi determinada por densidade óptica (D.O.) a 600 nm em espectrofotômetro (Femto 800 XI); a biomassa foi obtida multiplicando a densidade óptica pelo fator de diluição.

4.5.2 Número de células viáveis e viabilidade celular

O número de células viáveis e viabilidade celular foram determinados por contagem direta em câmara de Neubauer, utilizando a coloração diferencial das células pela solução de azul de metileno em microscópio binocular, metodologia descrita por Copersucar (1987).

Os resultados de células viáveis foram expressos em células/mL (Equação 3) e o de viabilidade em percentagem (%) de células viáveis (Equação 4).

$$N^{\circ} \text{ de cél. viáveis/mL} = n^{\circ} \text{ cél. viáveis nos 25 campos} \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (\text{Eq 3})$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ cél. viáveis nos 25 campos}}{n^{\circ} \text{ cél. totais nos 25 campos}} \times 100 \quad (\text{Eq 4})$$

4.5.3 Consumo de substrato – AR e ART

A concentração dos açúcares foi avaliada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) descrito por MILLER (1959) para a determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), com leitura em espectrofotômetro a 540nm.

Para a determinação do ART foi realizada a hidrólise de uma alíquota da amostra com ácido clorídrico 1,3N e aquecimento em banho-Maria a 60°C por 10 min, após resfriamento e neutralização com NaOH 4N, a amostra foi diluída convenientemente para, então, proceder com o método DNS. A conversão da absorbância para concentração de açúcar é realizada a partir de uma curva de calibração obtida com solução padrão de glicose 1 g/L. Os resultados foram expressos em g/L.

O consumo de substrato foi obtido por cálculo, subtraindo o açúcar final (não utilizado) do açúcar inicial.

4.5.4 Desprendimento de CO₂

Para a determinação de CO₂ liberado foi realizada a pesagem do mosto no tempo 0 de fermentação e após 24h, promovendo a agitação do mosto para que todo o gás seja liberado antes das pesagens, possibilitando a análise das diferenças de massas.

4.5.5 Análise da presença de contaminantes bacterianos

Para confirmação da presença ou ausência de contaminação no mosto antes da fermentação (Tempo 0h) e após a fermentação (Tempo 24h), foi realizada a inoculação de uma alíquota dos mostos em placas de Petri, sendo utilizado o método de espalhamento em placa. Neste caso, 100µL da amostra a ser analisada foram transferidos para o meio de cultura solidificado, sendo espalhados por toda a superfície do meio de cultura com o auxílio da alça de Drigalski, (TORTORA et al., 2012). Após a inoculação e o espalhamento, a placa foi incubada em estufa a 35°C por 48h para posterior averiguação de presença de contaminantes.

O meio de cultivo utilizado para o desenvolvimento dos contaminantes presentes no meio fermentativo foi o MRSA (De Man, Rugosa and Sharpe Agar) adicionado de 1 mL de solução Actidiona 0,1% / 100mL de meio, para impedir que a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, predomine na placa e não seja possível a visualização dos contaminantes.

4.5.6 Determinação do pH

O pH inicial e final do mosto fermentado foi obtido por processo eletrônico, utilizando o aparelho potenciômetro que permite uma leitura direta, simples e precisa do pH. O potenciômetro utilizado foi da Marca Marconi, seguindo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.5.7 Determinação da Acidez

A Acidez inicial e final do mosto fermentado foi obtida utilizando o método de titulometria, onde a amostra, em presença do indicador fenolftaleína, foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M até seu ponto de viragem, coloração rósea, de acordo com procedimento descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). A acidez total foi calculada conforme Equação 5.

$$Acidez \left(\%, \frac{v}{v} \right) = \frac{Vol. \text{ de NaOH } 0,1M \text{ gasto na titulação (mL)} \times 1,043}{mL \text{ da amostra utilizada na titulação} \times 10} \times 100 \quad (Eq \ 5)$$

4.5.8 Teor Alcoólico

Após o final das 24h de fermentação, o mosto foi centrifugado, separando vinho e levedura, no qual o vinho sem levedura foi utilizado para determinação do teor alcoólico.

A determinação do teor alcoólico foi realizada a partir do método do microdicromato, adaptado de Joslyn (1950, no qual 1mL da amostra foi destilada no aparelho REDUTEC, o destilado é recolhido em um Erlenmeyer com tampa contendo 5mL de água destilada. Após a destilação, foi adicionado ao Erlenmeyer 20 mL da solução ácida de dicromato de potássio (33,678 g.L⁻¹), o mesmo foi submetido a banho-Maria a 60°C por 25 minutos. Ao término dos 25 minutos o frasco foi resfriado e adicionado de 1mL do indicador Difenilamina-4 sulfonato de bário para então ser realizada a titulação com solução de Sulfato ferroso amoniacal até a coloração verde escuro.

O teor alcoólico foi obtido utilizando as Equações 6 e 7.

$$Etanol \ (g/L) = 158,2 \times \left(1 - \frac{Vol. \text{ de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra (mL)}}{Vol. \text{ de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do Branco (mL)}} \right) \quad (Eq \ 6)$$

$$Etanol \ (\%, v/v) = 20,04 \times \left(1 - \frac{Vol. \text{ de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra (mL)}}{Vol. \text{ de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação do Branco (mL)}} \right) \quad (Eq \ 7)$$

4.6 Cálculo dos parâmetros fermentativos

A partir dos resultados obtidos nas diferentes fermentações foi possível calcular o Rendimento Ideal/Teórico (RI) (Equação 8) e Prático (RP) (Equação 9) da fermentação, assim como sua produtividade (PF) (Equação 10).

$$RI \ g \ de \ etanol = \frac{51,11 \times ART \ consumido \ na \ fermentação}{100} \quad (Eq \ 8)$$

$$RP \% = \frac{g \text{ de etanol produzido no vinho}}{g \text{ RI}} \times 100 \quad (\text{Eq 9})$$

$$PF \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1} = \frac{\text{concentração de etanol no vinho (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}} \quad (\text{Eq 10})$$

4.6.1 Sacarose utilizada para crescimento celular e para formação de produto

Para a determinação da sacarose utilizada para crescimento celular e para formação de produto foi utilizada a metodologia proposta por Venturini-Filho et al. (2013), na qual é calculada a sacarose respirada e fermentada, de acordo com as etapas a seguir:

1º Determinar a Massa de etanol (g/L) produzida no processo;

2º A partir da massa de etanol, calcular a massa de sacarose fermentada (Equação 2);

3º Determinar a massa total de CO₂ (g/L) produzida no processo;

4º A partir da massa de etanol determinada, converter em massa de CO₂ produzida pelo metabolismo anaeróbico (equação 2);

5º A massa de CO₂ produzida pelo metabolismo aeróbico é calculada mediante a subtração da massa total de CO₂ produzida no processo pela massa de CO₂ produzida pelo metabolismo anaeróbico;

6º Mediante a massa de CO₂ produzida pelo metabolismo aeróbico é determinada a massa de sacarose respirada (equação 1);

7º A massa total de sacarose catabolizada é a soma da sacarose respirada com a fermentada; no qual, é possível calcular a % de sacarose fermentada e a respirada durante o processo, por intermédio das Equações 11 e 12, respectivamente.

8º A massa total de sacarose do processo é a soma da massa total de sacarose catabolizada com a sacarose residual.

$$\text{Sacarose Fermentada \%} = \frac{\text{Sacarose fermentada (g/L)}}{\text{Total de sacarose catabolizada (g/L)}} \times 100 \quad (\text{Eq 11})$$

$$\text{Sacarose Respirada \%} = \frac{\text{Sacarose respirada (g/L)}}{\text{Total de sacarose catabolizada (g/L)}} \times 100 \quad (\text{Eq 12})$$

4.6.2 Velocidade específica de crescimento microbiano

Para a determinação da velocidade específica de crescimento (μ_x) da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi construído o gráfico de $\ln (X/X_0)$ em função do tempo, no qual X_0 representa a biomassa (D.O.) inoculada no tempo zero de fermentação e X a biomassa (D.O) determinada em cada tempo.

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$) é obtido pelo coeficiente angular da reta ajustada aos valores obtidos na fase exponencial do crescimento celular, pois nesta fase de crescimento a velocidade específica é constante e máxima, ou seja, $\mu_x = \mu_{\max}$ (HISS, 2001; STROPPIA et al., 2009). Nestas circunstancia, onde a velocidade de crescimento é diretamente proporcional a concentração (X) em função do tempo, é possível chegar na equação 13.

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu_{\max} . t$$

(Eq 13)

4.7 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e Testes de Tukey ao nível de significância de 5%. As médias do teor de etanol (%), produtividade (g.L-1.h-1) e rendimento (%) dos cinco ciclos de cada tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey, por delineamento em blocos casualizado (DBC), em fatorial 2x2 (com e sem esterilização e com e sem tratamento ácido das células de levedura), ao nível de $\alpha=0,05$ de significância.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS (Statistical Analysis System, Version 9.3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do melaço

O mosto utilizado neste trabalho foi preparado com Melaço diluído nas concentrações desejadas para os experimentos. As características do Melaço estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização do melaço

Caracterização do Melaço	
Umidade (%)	27
Cinza (%)	5,3
SST (° Brix)	71
ART (g/L)	810
AR (g/L)	105
pH	5,7

SST – sólidos solúveis totais

ART – açúcares redutores totais

As características do melaço podem ser alteradas conforme a qualidade da matéria prima, no caso a cana-de-açúcar, a região do plantio, o processo de fabricação do açúcar, entre outros fatores.

Esses fatores fazem com que seja difícil apresentar uma característica exatamente padrão aos melaços em geral, porém Clarke et al. (2012), relata que o melaço de cana-de-açúcar pode apresentar em sua composição cerca de 25% de água, 50% de açúcares totais e 7% de cinzas.

Comparando essas características citadas por Clarke et al. (2012) com o melaço utilizado neste trabalho, é possível observar que as características são semelhantes, havendo apenas um aumento na porcentagem de açúcares totais, no qual este aumento pode ser devido a fabricação do açúcar de onde proveio o melaço.

5.2 Estudos cinéticos da linhagem CAT-1 em mosto contendo Melaço 8°Brix (M8) e Melaço 15°Brix (M15)

A levedura *S. cerevisiae* linhagem CAT-1 foi cultivada em mosto contendo melaço 8°Brix (M8) e depois transferida para mosto contendo melaço 15°Brix (M15),

objetivando a propagação das células e adaptação osmótica ao meio. Porém, para observar melhor a taxa de crescimento da levedura e sua viabilidade foi realizado previamente um estudo da cinética da linhagem CAT-1 nas duas concentrações.

Para o estudo da cinética foi determinado: densidade ótica (D.O. – 600nm), número de células viáveis, viabilidade celular e consumo de substrato (AR – Açúcar Redutor e ART – Açúcar Redutor Total). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.

(1) A

(1) B

(2) A

(2) B

(3) A

(3) B

(4) A

(4) B

Figura 4. (1) Densidade ótica - D.O.; (2) número de células viáveis; (3) viabilidade celular e (4) Açúcar Redutor (AR) e Açúcar Redutor Total (ART) obtidos durante cultivo da linhagem CAT-1 em Melaço 8°Brix (M8) (A) e Melaço 15°Brix (M15) (B) a 30°C

O crescimento dos microrganismos apresenta as seguintes fases principais: Fase “lag” – no qual os microrganismos não apresentam um aumento de biomassa por estar se adaptando ao meio; Fase exponencial – no qual os microrganismos se encontram no máximo de suas capacidades, sendo o valor de substrato superior as necessidades celular; Fase estacionária – no qual a velocidade de crescimento dos microrganismos diminui, apresentando valores semelhantes de células viáveis e inviáveis. Isso ocorre pelo esgotamento do substrato e de O₂; Fase de declínio – no qual a quantidade de células inviáveis superam de forma progressiva as viáveis (HISS, 2001).

Os perfis de crescimento da linhagem CAT-1, avaliado como D.O., nos mostos M8 e M15 são semelhantes (Figura 4 - (1)A e (1)B), pois o rendimento de biomassa (medida em D.O.) por quantidade de ART foi semelhante nos dois mostos; no mosto M8 a relação DO/ART foi 0,23 enquanto que no mosto M15 foi 0,22. As células de levedura utilizaram aproximadamente 5h para a adaptação da levedura ao meio (fase Lag) em ambas as concentrações (M8 e M15), após esse período a massa de levedura foi aumentando ao longo do tempo de incubação (fase Log) até que estabilizou (fase estacionária). A fase de declínio não foi observada nestes experimentos. Isso mostra que ocorreu uma adaptação das células de levedura de um meio menos concentrado (M8) para outro mais concentrado (M15).

A determinação do número de células viáveis assim como sua viabilidade é importante para analisar se de um meio para o outro, no caso do meio M8 para o M15, está ocorrendo adaptação e crescimento das células apesar do aumento da concentração de açúcar. Na Figura 4 pode ser observado que o número de células viáveis para M8 ((2)A) e M15 ((2)B) apresentou resultados semelhantes, havendo crescimento das células, iniciando com 10⁶ cél/mL e finalizando com 10⁸ cél./mL, atingindo o objetivo inicial de adaptação e aumento de biomassa. Em relação a viabilidade, tanto no meio M8 ((3)A) quanto no meio M15 ((3)B), as células mantiveram sua viabilidade celular perto dos 100%, mostrando uma maior resistência da célula ao aumento das concentrações, não havendo dificuldade de adaptação de um meio para o outro.

Em relação ao consumo de açúcar redutor – AR, os resultados do mosto inoculado M8 ((4)A) foi de um consumo constante até chegar perto de 0 g/L, constatando que a levedura consumiu os açúcares redutores ao mesmo tempo em que hidrolisou os não redutores. Enquanto que, no meio M15 ((4)B) foi apresentado

um comportamento parcialmente diferente, no qual a levedura consumiu primeiro os açúcares redutores disponíveis no mosto, podendo ser observado um declínio de AR disponível no mosto até o tempo 5h, para então no tempo 10h a quantidade de AR disponível aumentar consideravelmente, mostrando que a levedura diminuiu consideravelmente sua taxa de consumo dos açúcares redutores para hidrolisar os não redutores, formando mais açúcares redutores, para então prosseguir com o consumo desses açúcares em sua taxa normal, havendo a continuidade do declínio na curva até quase todo o consumo dos açúcares. Isso pode ter ocorrido pois, quando em alta concentração de substrato, a síntese da invertase começa a ser reprimida (DARIO, 2012). Apesar de Dario (2012), relatar que valores acima de 15g/L de açúcar já é capaz de reprimir a síntese da invertase; no presente trabalho, essa repressão não pode ser percebida em M8 (80 g/L), apenas em M15 (150 g/L).

A levedura *S. cerevisiae* produz a enzima invertase que é responsável pela hidrólise da sacarose em açúcares redutores (glicose e frutose). Essa hidrólise pode ser realizada de forma extracelular ou intracelular, sendo a extracelular a principal rota de hidrólise do substrato (DARIO, 2012). Porém, quando a presença de açúcares redutores é alta, a expressão do gene (*SUC*) que codifica a enzima invertase é reprimida, levando a levedura a consumir essa glicose e frutose disponível no mosto, para então, quando a concentração baixar, a invertase continuar sendo traduzida e produzir mais glicose e frutose, elevando novamente a concentração de AR no mosto.

Em relação ao consumo dos açúcares redutores totais - ART, tanto no meio M8 (C) quanto no meio M15 (D) as células de levedura apresentaram consumos muito semelhantes, consumindo praticamente todo o substrato até o fim do tempo de incubação, não mostrando dificuldade de adaptação de um meio menos concentrado para o outro mais concentrado, precisando apenas de mais tempo para metabolizar todo o substrato.

Para a determinação da velocidade específica de crescimento (μ_x) da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi construído o gráfico de $\ln(X/X_0)$ em função do tempo, como apresentado na Figura 5, no qual X_0 representa a biomassa (D.O) inoculada no tempo zero de fermentação e X a biomassa (D.O) determinada em cada tempo.

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) é obtido pelo coeficiente angular da reta ajustada aos valores obtidos na fase exponencial do

crescimento celular, pois nesta fase de crescimento a velocidade específica é constante e máxima, ou seja, $\mu_x = \mu_{\max}$ (HISS, 2001; STROPPIA et al., 2009).

Figura 5. Gráfico para determinação $\mu_{\max}$ da linhagem CAT-1 em meio M8 e meio M15

A partir da equação da reta (Figura 5), foi possível encontrar os resultados de $\mu_{\max}$ da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 em sua fase exponencial de crescimento, tanto em mosto M8 (80 g/L) quanto em mosto M15 (150 g/L), que corresponde a $0,37 \text{ h}^{-1}$ e $0,31 \text{ h}^{-1}$ respectivamente.

A análise de 30 linhagens de leveduras fermentativas, dentre elas 24 *Saccharomyces*, isoladas de alambique, destilarias de cachaça e de etanol, utilizando como mosto meio sintético a 40 g/L de glicose, foi observado valores de μ_x entre $0,38 \text{ h}^{-1}$ a $0,67 \text{ h}^{-1}$ (OLIVEIRA et al., 2004).

A caracterização de leveduras coletadas e isoladas de 2 alambiques artesanais da região de Belo Horizonte, após fermentadas em mosto composto por caldo de cana diluído a 10°Brix, apresentaram valores experimentais de $\mu_{\max}$ entre $0,24 \text{ h}^{-1}$ e $0,4 \text{ h}^{-1}$. Neste trabalho, os valores de velocidade específica máxima de crescimento foi determinado pelo gráfico de $\text{Ln}(X/X_0)$ em função do tempo, construído a partir da curva de crescimento celular com os valores encontrados na fase exponencial de crescimento das leveduras (STROPPIA et al., 2009). Em revisão

bibliográfica, Alves (1996) relata valores de $\mu_{\max}$ entre $0,19 \text{ h}^{-1}$ e $0,64 \text{ h}^{-1}$ esperados para *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo em seu trabalho valores de $\mu_{\max}$ entre $0,14$ e $0,32 \text{ h}^{-1}$ utilizando como mosto melaço diluído a 40 g/L e suplementado com extrato de levedura ($2,5 \text{ g/L}$).

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com esses valores obtidos por diferentes autores, pode-se dizer que a linhagem CAT-1 está dentro dos padrões de velocidade específica de crescimento, atingindo bons resultados.

5.3 Cinética de fermentação da linhagem CAT-1 em mosto de alta concentração (M30)

A levedura *S. cerevisiae* linhagem CAT-1, propagada em M8 e depois em M15, foi transferida para mosto contendo alta concentração de melaço (M30), com o intuito de adaptação osmótica ao meio e conhecimento de sua cinética de fermentação nesta condição. Para isso foram realizadas análises da sua atividade: determinando densidade ótica (D.O.), número de células viáveis, viabilidade celular e consumo de substrato (AR – Açúcar Redutor e ART – Açúcar Redutor Total). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Densidade ótica – D.O (1), Número de células viáveis/mL (2), Viabilidade % (3) e Concentração de substrato – AR e ART (4) obtidos durante cultivo da linhagem CAT-1 em mosto M30, contendo melão 30°Brix a 30°C.

O mosto M30, com o objetivo de adaptação da linhagem CAT à fermentação (Figura 6), proporcionou um aumento de biomassa ao longo do tempo, no qual após 15h de fermentação iniciou a fase de declínio da taxa crescimento (Fig 6(1)). Apesar da fase de declínio, a levedura mostrou estabilidade no número de células viáveis/mL durante todo o período de fermentação (Fig 6(2)), tendo um leve declínio a partir de 25h.

A Viabilidade celular (Fig 6(3)) apresentou decréscimo a partir de 10 h de fermentação até atingir 60% em 30 h, no entanto, os valores de DO tiveram um pequeno declínio. Isso se deve, possivelmente, a uma taxa de brotamento alta, mantendo, praticamente, o número de células viáveis/mL inalterado durante toda a fermentação, dado que inicia e termina com 10^9 cél viáveis/mL. Mesmo o número de

células viáveis se mantendo constante, uma viabilidade muito baixa pode prejudicar próximos ciclos de fermentações, em caso de fermentações com reciclo de células.

Uma das causas para a diminuição da viabilidade é a concentração elevada de substrato no mosto, causando um estresse osmótico nas células de levedura, assim como, produzindo uma quantidade significativa de álcool com o passar do tempo de fermentação, fazendo com que a célula sofra com isso nos períodos finais da fermentação. Outra hipótese para essa diminuição da viabilidade, principalmente nos períodos de 25h a 30h de fermentação, podem ter ocorrido pela disputa das células pelos nutrientes disponíveis no meio, que nesse período já estava se esgotando, fazendo com que houvesse um desgaste maior nas células de levedura por um período elevado do tempo de fermentação, já que o mesmo poderia ter sido interrompido em 24h, onde praticamente todo o substrato já havia sido metabolizado.

A Figura 6(4) sugere que apesar da alta concentração de substrato (300 g/L) a levedura conseguiu metabolizar os açúcares, ou seja, ocorreu uma adaptação das células ao mosto, com consumo de quase todo o substrato em cerca de 24h. Pode ser observado também o comportamento de consumo da levedura, onde a mesma, primeiro metaboliza o açúcar redutor presente no mosto para então hidrolisar os não redutores, no caso a sacarose, continuando assim a metabolizar os açúcares redutores, agora disponíveis e não hidrolisando e metabolizando de forma contínua como era o esperado.

Isso pode ter ocorrido, pois a glicose reprime a síntese da invertase, a enzima necessária para a utilização da sacarose (DARIO, 2012), onde a sacarose só será catabolizada quando a glicose do meio diminuir sua concentração, como também discutido no cultivo em meio M15 (Figura 4(4(B))).

Outro ponto que convém ressaltar é que a alimentação do mosto no início da fermentação, se assemelhando a um sistema descontinuo alimentado, favorece a metabolização dos açúcares. Isso pode ser observado comparando a Figura 4(4(B)), que apresenta o consumo de ART em mosto 150 g/L, com a Figura 6(4), que apresenta o consumo de ART em mosto 300 g/L. No mosto contendo 150 g/L de açúcares redutores, as células de levedura, ressuspensas em solução salina, foram adicionadas diretamente no mosto; nessa condição, após 5h de incubação apenas 15% dos açúcares foram consumidos. Contudo, na fermentação do mosto 300 g/L, o mosto foi adicionado sobre o pé de cuba (levedura ressuspensa em solução salina), nos tempos 0h, 1h e 2h de incubação, completando o volume total a ser fermentado.

Neste caso, com alimentação, no período de 5h a levedura conseguiu metabolizar aproximadamente 56% dos açúcares disponíveis no meio, ou seja, cerca de 4x mais que o mosto sem alimentação e com menor concentração de açúcares.

Isso ocorreu, pois com a alimentação no início da fermentação, ocorre diluição do mosto pela solução salina que suspende as células de levedura, com isso, as células de levedura passam a ter maior facilidade de se adaptar ao meio e consumir esses substratos, que vão aumentando sua concentração aos poucos até atingir o volume e a concentração esperados.

5.4 Fermentação da linhagem CAT-1 com e sem reciclo de células em mosto com alta concentração de açúcares

Após obtidos os resultados da cinética de fermentação a partir de mosto 30°Brix (Figura 6), foi observado uma queda muito elevada da viabilidade celular (Figura 6 (3)), no qual a fermentação iniciava próxima de 100% de viabilidade e finalizava com apenas 60%, isso em apenas um único ciclo. Mesmo com essa queda na viabilidade a levedura teve uma boa adaptação ao meio concentrado, conseguindo consumir praticamente todo o açúcar e manter seu número de células viáveis.

Como os tratamentos teriam cinco ciclos de fermentação de 24h cada um, foi decidido baixar a concentração de sólidos solúveis para 26°Brix. Com isso houve um aumento significativo na viabilidade celular das leveduras ao fim do primeiro ciclo, onde a queda foi maior apenas do quarto para o quinto ciclo de fermentação.

Assim, quatro tratamentos fermentativos foram realizados, com 5 ciclos de 24h cada, utilizando como mosto Melaço diluído a 26°Brix e como agente de fermentação a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1. O diferencial de cada fermentação foi a esterilização do mosto (estéril e não estéril) e o tratamento ácido do creme de levedura, de um ciclo para outro (com e sem tratamento ácido), sendo: M1 (mosto não estéril, sem tratamento ácido da levedura); M1A (mosto não estéril, com tratamento ácido da levedura); M2 (mosto estéril, sem tratamento ácido da levedura) e M2A (mosto estéril, com tratamento ácido da levedura).

Os parâmetros avaliados foram crescimento (densidade ótica (D.O.), determinação de número de células viáveis e viabilidade celular), concentração de açúcares (AR e ART), pH, acidez total, desprendimento de CO₂, teor alcoólico, e presença de contaminantes por meio de plaqueamento em meios seletivos.

A partir dos resultados obtidos foi calculada a sacarose utilizada para crescimento celular (sacarose respirada) e para formação de produto (sacarose fermentada) em cada tratamento.

5.4.1 Parâmetros de crescimento da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos

Os parâmetros avaliados de densidade ótica (D.O. 600nm), número de células viáveis por mL e viabilidade celular (%) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 nos quatro tratamentos ao longo de cinco ciclos fermentativos estão apresentados na Tabela 3.

Os resultados mostram que tanto para D.O., como número de células viáveis e viabilidade celular é possível observar uma diminuição gradativa ao longo dos ciclos de fermentação, em todos os tratamentos. Em relação a concentração de células apesar da biomassa aumentar do início para o fim de cada ciclo, ao longo dos 5 ciclos, as células de biomassa final foram diminuindo. Os tratamentos que obtiveram maior perda de concentração do fim do primeiro ciclo para o fim do último ciclo, apesar da proximidade dos valores, foram os que apresentavam mosto estéril com e sem tratamento ácido. Isso pode ter ocorrido, pois os contaminantes presentes nos tratamentos com mosto não estéril podem ter influenciado na concentração final de biomassa, fazendo com que esses tratamentos apresentassem maior concentração de biomassa final quando comparado com os tratamentos com mosto estéril.

Tabela 3. Densidade ótica (D.O.), Número de cél. viável/mL e Viabilidade celular durante fermentação da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos em cada ciclo de 24h de fermentação.

	M1		M1A		M2		M2A	
Densidade ótica (D.O)								
	t ₀	t _f	t ₀	t _f	t ₀	t _f	t ₀	t _f
1º Ciclo	48,2	63,6	62,3	61,5	47,0	62,7	54,2	70,8
2º Ciclo	47,6	61,9	64,8	57,1	40,0	62,2	49,2	56,6
3º Ciclo	53,0	59,5	56,3	57,2	53,0	60,8	50,3	63,9
4º Ciclo	51,3	52,6	55,4	57,2	62,3	58,5	55,2	59,6
5º Ciclo	55,9	53,9	61,5	55,6	52,1	48,3	51,5	53,6
Número de cél. viável/mL (x 10 ⁹)								
	t ₀	t _f	t ₀	t _f	t ₀	t _f	t ₀	t _f
1º Ciclo	1,33	1,30	1,37	1,30	1,48	1,36	1,21	1,32
2º Ciclo	1,23	0,917	1,75	1,04	1,05	1,14	1,07	0,922
3º Ciclo	1,05	0,815	0,904	0,715	0,922	0,921	0,832	0,825
4º Ciclo	0,946	0,756	0,684	0,657	1,07	0,804	0,847	0,603
5º Ciclo	0,761	0,667	0,600	0,476	1,08	0,625	0,629	0,512
Viabilidade celular (%)								
	t ₀	t _f	t ₀	t _f	t ₀	t _f	t ₀	t _f
1º Ciclo	99,7	98,9	100	97,3	99,8	98,9	99,6	97,7
2º Ciclo	98,6	94,9	96,7	88,6	98,7	92,9	96,3	84,8
3º Ciclo	94,0	89,4	87,0	77,1	90,0	88,7	81,6	79,0
4º Ciclo	87,7	86,8	74,8	70,0	90,5	85,5	74,9	67,3
5º Ciclo	86,3	81,0	63,5	55,5	83,9	76,5	68,8	57,8

M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

Em relação ao número de células viáveis presentes no início e no final de cada ciclo, assim como a viabilidade celular, foi possível observar que os valores foram mais baixos para fermentação onde houve tratamento ácido do creme de levedura de um ciclo para o outro, ou seja, M1A e M2A. Já as fermentações sem tratamento ácido apresentaram maiores valores de viabilidade e número de células viáveis, no qual M1 (mosto não estéril sem tratamento ácido) apresentou melhores resultados, tendo no final do 5º ciclo 81% de células viáveis. Um fator para esse resultado é que o tratamento ácido, apesar de alguns autores, como Menezes (1980) dizerem que auxilia no controle de contaminantes, pode ser mais agressivo as células de levedura, fazendo com que haja uma queda em sua viabilidade, podendo afetar o rendimento de fermentação.

5.4.2 Consumo de substrato – AR e ART

A fermentação nos quatro tratamentos iniciou com a alimentação do mosto nas mesmas concentrações, totalizando 260g/L de açúcar redutor total inicial. Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de Açúcar Redutor Residual (ARR) e Açúcar Redutor Residual Total (ARRT) dos tratamentos ao final de cada ciclo fermentativo (24h). Na Figura 7 estão apresentados os valores do ARRT, com uma melhor visualização das diferenças.

Tabela 4. Açúcar Redutor Residual (ARR) e Açúcar Redutor Residual Total (ARRT) dos tratamentos em cada ciclo de fermentação

Ciclo	M1		M1A		M2		M2A	
	ARR (g/L)	ARRT (g/L)	ARR (g/L)	ARRT (g/L)	ARR (g/L)	ARRT (g/L)	ARR (g/L)	ARRT (g/L)
1º ciclo	8,3	9,1	7,1	5,3	7,7	8,4	7,2	5,6
2º ciclo	11,6	15,1	7,3	6,4	13,0	20,7	13,4	12,4
3º ciclo	21,6	31,0	10,9	9,1	29,0	41,8	13,1	13,6
4º ciclo	21,6	37,7	12,1	10,3	37,2	65,2	9,9	10,2
5º ciclo	25,8	50,3	10,9	10,0	35,6	75,4	9,6	11,1

M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

Os resultados de ARR e ARRT indicam uma quantidade maior de substrato não utilizado nas fermentações onde as leveduras não passaram por tratamento ácido durante os ciclos, indicando que as leveduras metabolizaram melhor os açúcares quando submetidas ao tratamento ácido. Com isso é possível observar que apesar do tratamento ácido diminuir a viabilidade ao longo dos ciclos, o mesmo não afeta o consumo do substrato, pelo contrário, favorece a metabolização do mesmo.

Figura 7. Açúcar Residual ao final de cada ciclo de fermentação da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos: M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

5.4.3 Valores de pH e acidez total

O pH e acidez total do mosto no início de cada ciclo e do vinho no final de cada ciclo fermentativo foram avaliados. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8. pH inicial do mosto e final do vinho (sup) e Acidez total inicial e final presente no mosto de cada ciclo de fermentação da linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos: M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

A análise da Figura 8 indica uma coerência entre os gráficos de pH e acidez total, pois a medida que os valores de acidez aumentam os valores de pH ficam mais baixos.

Em relação aos valores de pH e acidez do mosto inicial, ou seja, antes de ser inoculado e fermentado, foi possível constatar que os mostos que passaram por esterilização apresentaram valores maiores de acidez do que os que não foram estéreis. O esperado era o contrário, já que, os possíveis contaminantes presentes naturalmente no mosto, quando não estéril, poderiam aumentar sua acidez; mesmo assim a diferença entre os valores foi muito baixa, não chegando a ser significativa.

Durante os ciclos é possível verificar que o pH sofre maior decréscimo nos mostos fermentados onde houve o tratamento ácido do creme de levedura, mostrando que o mesmo pode influenciar no pH dos próximos ciclos.

O aumento de acidez durante o decorrer dos ciclos fermentativos foi igual para todos os tratamentos, atingindo valores acima de 8%. O valor mais baixo foi obtido no meio M1A (mosto sem esterilização e com tratamento ácido do creme de leveduras).

5.4.4 Desprendimento de CO₂

O desprendimento de CO₂ durante os 5 ciclos fermentativos está apresentado na Figura 9. A variação do desprendimento de CO₂ foi de 2,90 a 3,28 g por frasco, não havendo diferença significativa entre os diferentes tratamentos. A fim de facilitar os cálculos posteriores, os valores foram apresentados em g/L.

A análise da Figura 9 mostra que o comportamento do desprendimento de CO₂ apresenta perfil semelhante nos meios M1 e M2 (sem tratamento ácido da levedura) e M1A e M2A.

Figura 9. Desprendimento de CO₂ (g/L) durante a fermentação da linhagem CAT-1 em cada ciclo de fermentação, nos diferentes tratamentos: M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

5.4.5 Parâmetros fermentativos

A partir dos valores de açúcar consumido e teor alcoólico obtidos no final de cada ciclo fermentativo foi possível calcular os parâmetros fermentativos.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores do teor alcoólico obtido ao final de cada ciclo fermentativo.

Tabela 5. Teor alcoólico obtido ao final de cada ciclo fermentativo pela linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos

	M1		M1A		M2		M2A	
	Etanol (g/L)	EtoH (% v/v)	Etanol (g/L)	EtoH (% v/v)	Etanol (g/L)	EtoH (% v/v)	Etanol (g/L)	EtoH (% v/v)
1º ciclo	102,38	12,97	102,76	13,02	104,31	13,21	101,32	12,83
2º ciclo	101,40	12,85	93,55	11,85	101,00	12,65	97,90	12,45
3º ciclo	99,03	12,55	97,51	12,35	94,65	11,66	90,35	11,44
4º ciclo	91,37	11,57	98,35	12,46	89,98	10,96	108,84	13,79
5º ciclo	92,78	11,75	86,10	10,91	87,80	10,63	91,77	11,62

M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

Como pode ser observado, o teor alcoólico ao final de cada ciclo fermentativo foi diminuindo com os ciclos de fermentação, para todos os tratamentos. Isso pode ter ocorrido, pois ao longo dos ciclos a levedura sofre um estresse fazendo com que sua viabilidade celular diminua (Tabela 3), levando a uma diminuição na produção de etanol. Esse estresse é maior nos mostos compostos por concentrações de substrato mais elevados, como 260 g/L, e em células submetidas a tratamento ácido durante os ciclos. O valor mais elevado de etanol no 1º ciclo foi de 13,2% (v/v) encontrado no tratamento M2 (mosto estéril sem tratamento ácido da levedura), porém ao longo dos ciclos o tratamento M1 (mosto não estéril sem tratamento ácido da levedura) supera os valores de etanol produzidos por M2.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de rendimento e produtividade obtidos ao final de cada ciclo fermentativo.

Tabela 6. Rendimento e produtividade obtidos para cada ciclo fermentativo pela linhagem CAT-1 nos diferentes tratamentos

	M1		M1A		M2		M2A	
	Rend. (%)	Produt. (g.L.h ⁻¹)	Rend. (%)	Produt. (g.L.h ⁻¹)	Rend. (%)	Produt. (g.L.h ⁻¹)	Rend. (%)	Produt. (g.L.h ⁻¹)
1º ciclo	79,88	4,27	78,96	4,28	81,16	4,35	77,96	4,22
2º ciclo	81,06	4,22	72,22	3,90	82,52	4,21	77,56	4,08
3º ciclo	84,60	4,13	76,14	4,06	85,12	3,94	72,11	3,76
4º ciclo	80,54	3,81	77,12	4,10	91,00	3,75	85,51	4,54
5º ciclo	86,57	3,87	67,36	3,59	93,23	3,66	72,45	3,82

M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

A produtividade foi mais elevada no 1º ciclo de cada tratamento, exceto no meio M2A (mosto estéril, tratamento ácido), que apresentou produtividade máxima de 4,54 g.L.h⁻¹ no final do 4º ciclo fermentativo. Nos outros mostos estudados, os valores de produtividade foram decrescendo nos ciclos subsequentes; no geral, a produtividade variou de 3,6 (M1A e M2 ao final do 5º ciclo fermentativo) até 4,35 g.L.h⁻¹ no final do 1º ciclo

Quanto ao rendimento, pode-se observar um comportamento inverso da produtividade, no qual, M2 apresentou os melhores resultados seguido de M1 (ambos sem tratamento ácido do creme de levedura) e os rendimentos foram aumentando nos ciclos subsequentes. Enquanto, M1A e M2A (ambos com

tratamento ácido), no 1º ciclo de fermentação, apresentaram valores muito parecidos com M1 e M2, porém vão caindo consideravelmente ao longo dos cinco ciclos.

Isso ocorre pois o cálculo de Rendimento considera o teor alcoólico obtido na fermentação pelo rendimento teórico, o qual considera apenas o açúcar consumido. O açúcar consumido em M1 e M2 são bem diferentes dos açúcares consumidos em M1A e M2A, já que os dois últimos apresentam quantidade de açúcares residuais bem menores quando comparados com M1 e M2. Sendo assim, M1 e M2 apresentará valores de rendimento maiores, porém o valor de etanol e produtividade mostrará que não houve diferença considerável entre os tratamentos. Pois apesar da diferença de açúcares residuais entre os tratamentos com ácido e sem ácido do creme de levedura, ambos produziram valores aproximados de etanol.

5.4.6 Presença de contaminantes nos mostos e influência dos contaminantes na produção de etanol

O cultivo de amostras de vinho (mosto já fermentado) em MRSA adicionado de Actidiona indicou a presença ou ausência dos microrganismos contaminantes ao final de cada ciclo de fermentação para cada tratamento (M1, M1A, M2 e M2A), assim como no mosto inicial, antes de ser inoculado. A Tabela 7 apresenta estes resultados. Algumas fotos dos plaqueamentos realizados estão apresentados em ANEXO.

Tabela 7. Identificação da presença de contaminantes nos mostos estudados, ao final de cada ciclo de fermentação

Mosto		M2	M2A	M1	M1A
Mosto Inicial	T_0 (sem inóculo)	Negativo		Positivo (+ + + +)	
1º Ciclo	T_F	Negativo	Negativo	Positivo (+)	Positivo (+)
2º Ciclo	T_F	Positivo	Negativo	Positivo (+ +)	Positivo (+)
3º Ciclo	T_F	Negativo	Positivo	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
4º Ciclo	T_F	Negativo	Negativo	Positivo (+ + +)	Positivo (+ + +)
5º Ciclo	T_F	Negativo	Positivo (+)	Positivo (+ + + +)	Positivo (+ + + +)

No qual $\rightarrow T_0$: 0h de fermentação, T_F : Final da fermentação; Positivo: crescimento de contaminantes; Negativo: sem crescimento de contaminantes; Concentração dos contaminantes: + < + + < + + + < + + + +.

Plaqueamento em meio MRSA + Actidiona

M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

A análise dos plaqueamentos em meio MRSA adicionado de Actidiona indica que os mostos iniciais (sem fermentar) M2 e M2A apresentaram resultados negativos para contaminantes enquanto que os mostos iniciais M1 e M1A apresentaram resultado positivo de contaminantes, preenchendo toda a placa. Esse resultado era esperado já que os meios M1 e M1A não passaram por esterilização, fazendo com que os contaminantes naturalmente presentes no melaço permanecessem no mosto de fermentação.

Ao final de cada ciclo de fermentação o plaqueamento, para a maioria dos ciclos, resultou negativamente para a presença de contaminantes em mosto fermentado M2 e M2A, que foram aqueles que passaram por processo de esterilização. Porém, os mostos fermentados, M1 e M1A, apresentaram um aumento no crescimento de contaminantes ao longo dos cinco ciclos, mesmo M1A que passou por tratamento ácido de um ciclo para o outro, mostrando que o tratamento ácido não foi tão eficiente, neste caso, para controle de contaminantes. Ainda assim, o processo de esterilização mostrou ser eficiente no controle dos contaminantes, apresentando resultados negativos para a maioria dos ciclos onde o mosto foi esterilizado (M2 e M2A).

A análise da Tabela 7 indica que o mosto de fermentação, produzido mediante a diluição do melaço, apresentou presença de contaminantes, porém

quando submetido a processo de esterilização essa contaminação cessou. No entanto, o tratamento ácido não teve grande influencia na redução dos contaminantes.

Apesar da presença de contaminantes durante os ciclos de fermentação dos tratamentos M1 e M1A, não foi possível identificar diferença significativa quanto a produção de etanol, no qual em média os quatro tratamentos (M1, M1A, M2 e M2A) atingiram cerca de 12,2% de etanol (v/v). Com isso é possível afirmar que para esse experimento a presença dos contaminantes não influenciou na produção de etanol. A não diferença significativa pode ter ocorrido pois a quantidade de contaminante naturalmente presente no melaço é baixa (como pode ser observado em Anexo), sendo mais uma vantagem na utilização deste tipo de mosto.

Em estudo, realizado por Bonatelli et al. (2019), com fermentação a partir de mosto de caldo-de-cana estéril e não estéril com 3 ciclos fermentativos cada, com reciclo de célula, foi encontrado, em mosto não estéril, no primeiro ciclo 10^2 UFC/mL de contaminação por fungos e 10^4 UFC/mL de contaminação por bactérias, no qual ao final dos 3 ciclos os contaminantes atingiram 10^3 UFC/mL e 10^6 UFC/mL, respectivamente. Apesar da presença dos contaminantes, os autores concluíram que a falta de esterilização não foi capaz de afetar a fermentação e sugeriram que talvez sejam necessários mais ciclos para que haja algum efeito significativo na fermentação.

Tosetto (2002) recolheu amostras de mel final tratado (MT) e não tratado (MNT) para realizar teste de fermentação, no qual ao final do estudo o autor concluiu que o tratamento do melaço (diluição, esterilização e decantação, previamente realizado pela usina), apesar de ser capaz de aumentar sua pureza, não causou efeito na melhoria da qualidade fermentativa.

A partir dos resultados obtidos por esse trabalho, no qual a concentração inicial de contaminantes do mosto foi baixa, e outros estudos aqui mencionados é possível acreditar que os contaminantes não têm grande influência sobre a produção final de etanol. Porém, é válido observar que a quantidade de ciclos de fermentação nas usinas é superior as utilizadas no presente trabalho.

5.5 Comparação entre os tratamentos com e sem esterilização e com e sem tratamento ácido das células de levedura

Para comparar os tratamentos, mosto com e sem esterilização e com e sem tratamento ácido das células de levedura, os resultados obtidos nos 5 ciclos fermentativos foram tratados como repetições. Assim, a partir dos resultados obtidos em cada tratamento foi obtida uma média geral.

5.5.1 Teor alcoólico

Para melhor visualização dos valores de etanol durante os ciclos, os resultados obtidos nos 5 ciclos fermentativos foram tratados como repetições, sendo apresentado na forma de gráfico Box-plot (Figura 10), onde é possível observar a variação do teor alcoólico dentro de cada tratamento.

Figura 10. Box-plot do teor alcoólico (g/L) durante fermentação da linhagem CAT-1 em diferentes tratamentos: M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

A análise da Figura 10 indica que o teor alcoólico médio encontrado nos ciclos nos diferentes tratamentos não difere estatisticamente, no entanto, a variação do

teor alcoólico é diferente, sendo que no tratamento M1A é mais homogênea, ou seja, com menor variação entre os valores de etanol ao final de cada ciclo.

5.5.2 Análise estatística para teor alcoólico, produtividade e rendimento

As médias do teor de etanol (%), produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e rendimento (%) dos cinco ciclos de cada tratamento foram comparadas pelo teste de Tukey, por delineamento em blocos casualizados (DBC), em fatorial 2×2 (com e sem esterilização e com e sem tratamento ácido das células de levedura), ao nível de $\alpha=0,05$ de significância, como pode ser verificado na Tabela 8 e apresentado na Figura 11.

Tabela 8. Médias dos parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação da linhagem CAT-1

Parâmetros	Tratamentos				C.V (%)
	M1	M1A	M2	M2A	
Etanol (g/L)	97,39	95,65	95,55	98,04	-
Etanol (% v/v)	12,34 a	12,12 a	11,82 a	12,43 a	5,72
ARR					
Rendimento Prático (RP) (%)	82,53 a	74,36 b	86,61 a	77,11 b	-
Produtividade (PF) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	4,06 a	3,99 a	3,98 a	4,08 a	4,73

Condições da fermentação: Melaço diluído a 260g/L, 30°C por 24h

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

CV – coeficiente de variação

A análise dos resultados apresentados na Tabela 8 indica que não houve diferença significativa entre os tratamentos, ao nível de $\alpha=0,05$ de significância, quanto ao teor de etanol e produtividade. Mostrando que, para esse experimento, o tratamento ácido e a esterilização do mosto não afetaram a produção de etanol.

Figura 11. Médias de Etanol (g/L e %), RP (%) e PF (g.(L.h)⁻¹) dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento: M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

No entanto, houve diferença significativa entre os tratamentos submetidos a tratamento ácido e sem tratamento ácido. Isso ocorre pois o cálculo de Rendimento considera a quantidade de etanol produzida na fermentação pelo rendimento teórico, o qual considera apenas o açúcar consumido. O açúcar consumido em M1 e M2 são bem diferentes dos açúcares consumidos em M1A e M2A, já que os dois últimos apresentam quantidade de açúcares residuais bem menores quando comparados com M1 e M2. Sendo assim M1 e M2 apresentará valores de rendimento maiores, porém, o valor de etanol e produtividade mostrará que não houve diferença considerável entre os tratamentos. Pois, apesar da diferença de açúcares residuais entre os tratamentos com ácido e sem ácido do creme de levedura, ambos produziram valores aproximados de etanol. Mostrando que esse açúcar foi desviado para produção de outro composto que não o etanol.

Considerando esse resultado é possível dizer que a indústria pode começar a cogitar a hipótese da retirada do tratamento ácido do creme de levedura durante os ciclos, fazendo com que haja mais economia e segurança. Porém, é válido lembrar que as usinas podem chegar a reutilizar até 400 vezes as células de levedura, portanto, é necessária uma aplicação dentro da indústria para garantir esse resultado.

Apesar das diferenças de etanol e produtividade não serem significativas, ainda assim é possível verificar uma como foi a variação de valores dentro de cada tratamento e as diferenças entre os tratamentos. Essas variações de valores obtidos podem ser observadas nas Figuras 12 e 13.

Figura 12. Variação dos valores de Teor alcoólico dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento. M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura. O ponto central indica a média entre todos os ciclos.

Figura 13. Variação dos valores Produtividade e Rendimento dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento. M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura. O ponto central indica a média entre todos os ciclos.

A análise das Figuras 12 e 13 indica que o tratamento M2A apresenta melhor desempenho em ambos os parâmetros, seguido do tratamento M1. Porém, no tratamento M2A houve tanto a esterilização do mosto quanto tratamento ácido do creme de levedura, enquanto o tratamento M1 não ocorreu nenhum desses. Com isso é possível verificar realmente essa falta de significância entre os tratamentos, já que os melhores resultados são os extremos um do outro.

5.5.3 Produção de etanol em mosto contendo alta concentração de açúcar

Como visto anteriormente, antes de proceder com as fermentações sem e com esterilização do mosto e com e sem tratamento ácido do creme de levedura por cinco ciclos fermentativos cada, foi realizada uma cinética de crescimento para definir a melhor concentração de substrato e o melhor tempo de fermentação, assim como, anteceder o comportamento da linhagem CAT-1 em condições de alta concentrações de açúcares e mosto contendo apenas melaço diluído.

Fermentação com mosto de alta concentração refere-se a fermentações com altos teores de açúcares fermentescíveis, ou seja, mosto preparado acima de 25°Brix (MONTEIRO et al., 2018), portanto, ao ser utilizado o mosto a 26°Brix, o mesmo ainda pode ser considerado mosto de alta concentração.

A respeito da % de etanol, como já citado previamente, não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos, no qual ambos produziram em média 12,2% (v/v) de etanol (Tabela 5). Os processos de produção de etanol nas indústrias brasileiras utilizam um mix de caldo de cana e melaço entre 18–22°Brix e obtendo de 7-12% (v/v) de etanol (AMORIM et al., 2011; BREXÓ et al., 2017; CASTRO, 2013), sendo que o mais usual nas indústrias brasileiras são fermentações que atingem concentração de etanol de 8,5% (v/v), em média (CTBE, 2014). Já os processos com mosto de alta concentração (>25°Brix) têm como objetivo produzir níveis de etanol acima de 15% (v/v) ou 120g/L.

Como pode ser observado, mediante os dados citados, nenhum dos tratamentos chegou a atingir 15% (v/v) de etanol, chegando a produzir apenas 12,2% (v/v) de etanol em média. Porém, apesar das indústrias produzirem de 8-12% (v/v) de etanol, é citado pela CTBE (2014) que o mais usual nas usinas brasileiras é atingir 8,5% (v/v) de etanol. Com isso é possível concluir que, apesar de não atingir o valor esperado de 15% (v/v), ainda sim houve um aumento da produção de etanol mediante a média produzida nas indústrias brasileiras.

Em estudo da capacidade de fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em mosto de caldo de cana com altas concentrações de substrato durante 6 ciclos consecutivos de fermentação, Monteiro et al. (2018) observou que em mosto com 25°Brix, a produção de etanol atingiu, em média dos 6 ciclos, 14% (v/v), já quando suplementado com uréia em mosto 30°Brix, o produção de etanol ao final do 6º ciclo foi de 17% v/v, no entanto na média dos 6 ciclos foi de, aproximadamente, 15% (v/v).

É válido ressaltar que a fermentação neste estudo conseguiu atingir 12,2% (v/v) de etanol em mosto contendo apenas melaço diluído sem nenhum tipo de enriquecimento, enquanto que nas indústrias o mais usual é o mix de caldo de cana com melaço, que muitas vezes pode passar por algum processo de tratamento ou enriquecimento. Sabendo que o melaço apresenta baixo custo em relação ao caldo de cana por ser um resíduo da fabricação do açúcar, se tornam ainda mais interessantes os resultados obtidos, já que apenas com o melaço, diluído em concentrações mais elevadas, pode-se produzir mais etanol do que utilizando a cana-de-açúcar em concentrações normais de fermentação, diminuindo assim os custos de produção e reaproveitando resíduo.

5.6 Determinação da sacarose utilizada para crescimento celular (Sacarose Respirada) e para formação de produto (Sacarose Fermentada)

No metabolismo aeróbio a molécula de sacarose é oxidada na presença do oxigênio gerando gás carbônico (CO_2) e água, porém, no metabolismo anaeróbio, fermentação, a molécula de sacarose é oxidada na ausência de O_2 , gerando etanol e CO_2 (LEHNINGER, 2002). A partir destes dados é possível calcular quanto do açúcar foi usado pela via anaeróbia (sacarose fermentada) e o quanto foi usado pela via aeróbia (sacarose respirada) (VENTURINI-FILHO et. al., 2013).

Na Tabela 9 é possível verificar a % de sacarose, de cada tratamento, que foi desviada para o metabolismo anaeróbio (sacarose fermentada) e para o metabolismo aeróbio (sacarose respirada).

Após os cálculos de % de sacarose fermentada e respirada foi possível observar que os quatro tratamentos obtiveram cerca de 90% de sacarose fermentada e 10% de sacarose respirada, atendendo as porcentagens desejadas para uma fermentação alcoólica (BRIGGS et al., 2004 apud VENTURINI-FILHO et. al., 2013), o que corrobora com os valores encontrados por Venturini-Filho et. al. (2013) em fermentação a partir de melaço de cana-de-açúcar a 30°Brix.

Tabela 9. Médias da Sacarose Fermentada e Respirada dos cinco ciclos de fermentação para cada tratamento

Análises	M1	M1A	M2	M2A
Etanol (g/L)	97,4	95,7	95,5	98,0
CO ₂ Total (g/L)	124,4	126,7	117,4	123,3
CO ₂ Fermentação (g/L)	93,2	91,5	91,4	93,8
CO ₂ Respiração (g/L)	31,2	35,2	26,0	29,5
Sacarose Fermentada (g/L)	190,6	187,1	187,0	191,8
Sacarose Fermentada (%)	90,0	88,6	91,3	90,5
Sacarose Respirada (g/L)	21,3	24,0	17,8	29,5
Sacarose Respirada (%)	10,0	11,4	8,7	9,5
Sacarose Total Catabolizada (g/L)	211,9	211,2	204,7	212,0
Sacarose Total calculada do Processo (g/L)	240,5	219,4	247,0	222,6
Açúcar Redutor total da fermentação (g/L)	260,0	260,0	260,0	260,0
Sacarose Desviada (g/L)	19,6	40,7	13,0	37,4

M1- Mosto não estéril e sem tratamento ácido da levedura; M1A- Mosto não estéril e com tratamento ácido da levedura; M2- Mosto estéril e sem tratamento ácido da levedura; M2A- Mosto estéril e com tratamento ácido da levedura

A sacarose total calculada do processo, ou seja, toda sacarose presente nos tratamentos (fermentada, respirada e residual), ficou em cerca de 220 g/L para M1A e M2A enquanto que para M1 e M2 ficou em cerca de 245 g/L. Porém, o mosto de fermentação (melaço) foi diluído a 26°Brix e o Açúcar Redutor Total da fermentação foi calculado em 260 g/L, com isso é possível observar que houve desvio de parte da sacarose para produção de outros compostos que não o etanol, no qual esses desvios foram maiores nas fermentações com tratamento ácido (M1A e M2A).

Um desses compostos pode ter sido o Glicerol, que geralmente é produzido durante a fermentação, sendo sua via de síntese apontada como auxiliar na produção de etanol e consequentemente no crescimento celular (DARIO, 2012). De acordo com Dario (2012) alguns trabalhos mostram que quanto maior a concentração de substrato maior o acúmulo e produção do glicerol. A alta osmolaridade do meio extracelular leva a saída de água intracelular e para que isso não ocorra o metabolismo da célula passa a produzir e reter glicerol, permitindo assim o equilíbrio osmótico dentro da célula e evitando a perda de água e consequentemente a morte celular (HERSEN, 2008; CORDIER et al., 2007).

5.7 Relação entre sacarose respirada e fermentada, produção de etanol e ARRT encontrado em cada tratamento

Comparando os dados obtidos, para cada tratamento, de açúcares redutores residuais totais – ARRT (Tabela 4) e teor alcoólico (Tabela 5), há uma aparente incoerência com os resultados.

Nos meios M1 e M2 (sem tratamento do creme de leveduras) ocorreu uma sobra muito maior de ARRT, aproximadamente 5 vezes mais para M1 e 7 vezes mais para M2, quando comparado com os valores de M1A e M2A; enquanto que o teor de etanol foi muito próximo uns dos outros, fazendo com que não houvesse diferença significativa entre os tratamentos quanto ao etanol. No entanto, o esperado, seria que os tratamentos que resultaram em maior resíduo de açúcares totais obtivessem menor % de etanol quando comparado com os que resultaram em menor ARRT.

Essa incoerência pode ser desfeita quando comparado também com os resultados de sacarose respirada e fermentada (Tabela 9), no qual os quatro tratamentos apresentaram porcentagens de sacarose respirada e fermentada muito próximas, porém a sacarose desviada foi maior nas fermentações com tratamento ácido (M1A e M2A).

Ou seja, apesar das fermentações com tratamento ácido do creme de levedura (M1A e M2A) terem metabolizado a maior parte dos açúcares fermentescíveis, quando comparado com as fermentações sem tratamento ácido (M1 e M2), esses açúcares metabolizados não foram nem para a produção de etanol e nem para respiração e sim para produção de outros compostos. Enquanto que M1 e M2 tiveram maior sobra de ARRT, pois não estavam desviando tanto substrato para produção de outros metabólitos quando os outros dois tratamentos, mas também não estavam transformando em etanol. Justificando assim a diferença não significativa entre os resultados de etanol entre os tratamentos e a diferença significativa entre os resultados de rendimento, no qual, mostrou um consumo de substrato diferente entre tratamentos com ácido e sem ácido, porém esse substrato não foi utilizado para produção de etanol.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou o perfil fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem CAT-1 na produção de etanol, levando em consideração o efeito do melaço puro diluído, do processo de esterilização do mosto, do tratamento ácido do creme de levedura em fermentação com 5 ciclos consecutivos e de altas concentrações de substratos no mosto. Além disso, foi estudada a cinética de crescimento dessa linhagem antes de iniciar as fermentações. Ao final desse estudo é possível obter as seguintes ponderações:

- A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 obteve ótima adaptação de um meio menos concentrado (80 g/L) para um mais concentrado (150 g/L), havendo crescimento de biomassa e estabilidade da viabilidade, próxima a 100%.

- A linhagem CAT-1 apresentou valores de $\mu_{x\text{máx}}$ igual a $0,37\text{h}^{-1}$ e $0,31\text{h}^{-1}$ em mosto 80 g/L e 150 g/L, respectivamente; sendo considerado satisfatório e dentro dos padrões apresentados pela literatura.

- Durante os ciclos de fermentação foi possível observar uma queda maior no nº de células viáveis e de viabilidade para as fermentações que passaram por tratamento ácido do creme de levedura (M1A e M2A), indicando que o tratamento ácido pode prejudicar a viabilidade celular, porém auxilia na hidrólise e metabolização da sacarose, já que esses tratamentos apresentaram menor teor de ARRT.

- As fermentações com tratamento ácido das células de levedura (M1A e M2A), durante os ciclos fermentativos, obtiveram melhor metabolização dos açúcares, apresentando menor valor de ARRT quando comparados com os sem tratamento ácido (M1 e M2). Porém, esses açúcares metabolizados não foram direcionados para a produção de etanol e respiração, mas sim para outros compostos não identificados.

- Os tratamentos M1, M1A, M2 e M2A não apresentaram diferença significativa entre quanto a produção de etanol, apontando não haver discrepância, quanto a produção de etanol, em fermentação com ou sem esterilização do mosto e com ou sem tratamento ácido das células de levedura em 5 ciclos consecutivos.

- A alta concentração de substrato pode causar uma queda maior a viabilidade celular, principalmente ao longo dos ciclos. Por isso a importância do

estudo de cepas mais resistentes e também da concentração ideal para cada tipo de linhagem.

- Apesar das fermentações com alto teor de açúcares não atingirem os valores esperados de 15% (v/v) de etanol, foi possível obter na média de todos os tratamentos e ciclos 12,2% (v/v) de etanol, que ultrapassa os valores atingidos em fermentações de cerca de 20°Brix. Ressaltando que esse valor foi atingido em mosto de alta concentração (260g/L) composto por melaço de cana-de-açúcar sem nenhum tipo de tratamento, como filtração, ou enriquecimento, apenas diluído em água e em alguns casos, como no tratamento M1, sem processos de esterilização do mosto e sem tratamento ácido das células de levedura durante os ciclos de fermentação.

- Os contaminantes presentes nas fermentações sem o processo de esterilização do mosto (M1 e M1A) não tiveram grande influência na produção final de etanol, pois, possivelmente, o número de contaminantes não foi suficiente para causar dano a fermentação. Com isso, é possível concluir que, para esse experimento com 5 ciclos de fermentação, o processo de esterilização não tem grandes influências, tratando-se de melaço, podendo ser descartado. Para uma melhor clareza quanto a influência dos contaminantes, seria necessário introduzi-los em maior quantidade no processo de fermentação.

Portanto, os resultados obtidos indicam que, em condições de laboratório, o tratamento ácido das células de levedura antes de cada ciclo e o processo de esterilização do mosto não afetam a produção de etanol quando utilizado melaço como mosto e em condições laboratoriais que se aproximam das condições das usinas, porém não podem ser consideradas iguais ou semelhantes.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; DEQUIN.S; BLONDIN, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *S. cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, p.98-103, 2001.
- ALVES, J.G.L.F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. 1996. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1996.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenge of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, p. 1267 – 1275, 2011.
- AZHAR, S.H.M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S.A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J.A.; FAIK, A.A.M.; RODRIGUES, K.F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52 – 61, 2017.
- BASSI, A.P.G.; SILVA, J.C.G.; REIS, V.R.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Effects of single and combined cell treatments based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentation of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1661-1676, 2013.
- BONATELLI, M.L.; IENCZAK, J.L.; LABATE, C.A. Sugarcane must fed-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Impact of sterilized and non-sterilized sugarcane must. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal**, v. 112, p.1177–1187, 2019.
- BREXÓ, R.P.; SANT'ANA, A.S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 73, p. 423 – 434, 2017.
- BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A.; STEVENS, A. **Metabolism of wort by yeast**. In: _____ Brewing: Science and Practice, cap 12, p. 401-468. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, LLC, 2004
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação descontínua**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica, v. 2, cap 9, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.
- 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, pág. 639-646, 1984.

CASTRO, H.F. **Processos Químicos Industriais II – Apostila 2: Industria Alcooleira**. Escola de Engenharia de Lorena – EEL, Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 2013.

CECCATO-ANTONINI, S.R. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 80, 2018.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP, Brasil, 2004.

CERQUEIRA, D.P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil, 2013.

CLARKE, M; POLLACH, G.; SCHIWECK, H. **Sugar: Molasses**. In: Encyclopedia of Industrial Chemistry. v. 34, pg. 617-618, 2012.

CORDIER, H.; MENDES, F.; VASCONCELOS, I.; FRANÇOIS, J.M. A metabolic and genomic study of engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for high glycerol production. **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 364-378, 2007.

Comunicação Latin Americana. **Principais produtores de etanol no mundo**. Bioblog, São Paulo, SP, Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.bioblog.com.br/principais-produtores-de-etanol-no-mundo/>. Acesso: 27/01/2019.

COSTA, G.H.G.; MUTTON, M.J.R.; MISSIMA, J.O.D.; SILVANO, N.; SANTOS, R.F.P. **Qualidade tecnológica do melaço produzido com cana-de-açúcar bisada**. V Semana tecnológica – Biocombustível - FCAV/UNESP, 4p., Jaboticabal, SP, Brasil, 2012.

COSTA, V.M.; BASSO, T.O.; ANGELONI, L.H.P.; OETTERER, M.; BASSO, L.C. Produção de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentação alcoólicas industriais. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 32, p. 503-509, 2008.

CROCOMO, O.J.; GUTIERREZ, L.E. **Caminhos Metabólicos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Fundamentos*, v.1, capítulo 6, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. **Fermentação VHG com o dobro de etanol e 60% menos vinhaça**. Campinas, SP, Brasil, 2014. Disponível em: <https://lnbr.cnpem.br/fermentacao-vhg-dobro-etanol-menos-vinhaca/>. Acesso em: 11/01/2019.

DARIO, M.G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Universidade de São Paulo, Instituto Butantan de Pesquisas Tecnológicas, 2012.

DE SOUSA, J.L.U.; MONTEIRO, R.A.B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. Artigo. **FAZU em Revista**, n. 8, p. 100-107, 2011.

DELLIAS, M.T.F.; BORGES, C.D.; LOPES, M.L.; CRUZ, S.H.; AMORIM, H.V.; TSAI, S.M. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of lactobacilli contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1631-1644, 2018.

FRANCISCETTI, G. Perfil fermentativo da linhagem CAT-1 em mosto contendo alta concentração de açúcares em sistema descontínuo alimentado. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; SILVA, S.B.L. Aumento da produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar pela adição de benzoato. In: **ANAI S ESALQ**, v. 48, p. 1-21, Piracicaba – SP, 1991.

HERSEN, P.; MCCLEAN, M.N.; MAHADEVAN, L.; RAMANATHAN, S. Signal processing by the HOG MAP kinase patymay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 105, p. 7165-7170, 2008.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica*, v.2, cap. 6, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. Ed. São Paulo: IMESP, 1985.

JOSLYN, M.A. **Alcoholometry** In: _____ *Methods in food analysis: Applied to plant products*, cap. 15, p. 379-404, New York, 1950.

LEHNINGER, A. **Princípios da bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LI, F.; ZHAO, X.Q.; GE, X.Q.; BAI, F.W. An inovative consecutive batch fermentation process for very gravity ethanol fermentation, with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p. 1079-1086, 2009.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Produção de Etanol**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v. 3, cap. 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIU, Y.; ZHENG, P.; SUN, Z.; NI, Y.; DONG, J.; ZHU, L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. In: **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1736 – 1742, 2008.

MELO, H.F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. Tese de Doutorado (Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2006. 110 p.

MENEZES, T.J.B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo, SP, Brasil, 1980.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MONTEIRO, B.; FERRAZ, P.; BARROCA, M.; CRUZ, S.H.; COLLINS, T.; LUCAS, C. Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p.251, 2018.

MOREIRA, C.S.; SANTOS, M.S.M.; BARROS, N.S.; CARDOSO, C.A.L.; BATISTOTE, M. Análises dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natureza**, v. 37, p. 55-63, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/105902/2179460X18107>

NAVES, R.F.; FERNANDES, F.S.; PINTO, O.G.; NAVES, P.L.F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1, 2010.

NOBRE, T.P.; ALCARDE, A.R.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, p. 20-25, 2007.

OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; MORGANO, M.A.; SERRA, G.E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 19-24, 2004.

PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Selection of strains for efficient very high gravith bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology letters**, v. 32, p. 1655-1661, 2011.

RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T.P.; SILVA, J.B.; BASSO, L.C.; GOMBERT, A.K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 971-983, 2017.

- REIS, V.R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar metabolismo in yeasts: na overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. **Clinical Mycology Group, Life and Health Sciences Research Institute**, Braga – Portugal, capítulo 6, 2005.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.) Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica, v.2, p. 179-192, São Paulo, SP, Editora Edgar Blücher, 2001.
- SILVA-FILHO, E.A.; SANTOS, S.K.B, RESENDE, M.A.; MORAIS, J.O.F.; MORAIS JR, M.A.; SIMOES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13–23, 2005.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, p. 109-123, 2009.
- SOUSA, M.V.F. **Interação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentarum* na produção de cachaça artesanal**. Dissertação (Mestrado em Alimentos), Universidade Federal de Lavras – MG, 2005.
- STROPPIA, C.T.; ALVES, J.G.L.F.; FIQUEIREDO, A.L.F.; CASTRO, C.C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição especial, p. 1978-1983, 2009.
- TECLU, D.; TIVCHEV, G.; LAING, M.; WALLIS, M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**. v. 161, p. 1157 – 1165, 2009.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª edição, Porto Alegre, RS, Brasil, 2012.
- TOSETTO, G.M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, 2002.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR - UNICA, 2019. Relatório final da safra 2017/2018. Disponível em <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=102>. Acesso: 27/01/2019

VENTURINI-FILHO, W.G.; BRUNELLI, L.T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F.V.
Métodos simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica.
Boletim CEPPA. v. 31, p. 227-236, 2013.

ANEXO

Fotos das placas, após inoculação e incubação em MRSA adicionado de Actidiona, das mostras de vinho (mosto já fermentado) ao final de cada ciclo de fermentação para cada tratamento.