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

Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar

Diogo Patrini Cerqueira

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

**Piracicaba
2013**

Diogo Patrini Cerqueira
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar

Orientador:
Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ)**

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

Piracicaba
2013

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

Cerqueira, Diogo Patrini
Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar / Diogo
Patrini Cerqueira.- - Piracicaba, 2013.
66 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Suplementação 2. Sulfato de amônia 3. ACA 4. *Saccharomyces cerevisiae* I. Título

CDD 663.13
C416f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial a minha Mãe “Dona Mara” pela criação, dedicação, amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha namorada Susana Cabral pela companhia maravilhosa, respeito, paciência e por me incentivar sempre.

A minha orientadora Dra Sandra Helena da Cruz pela orientação durante a graduação e pós-graduação, pela amizade, pelo incentivo, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários de setor de açúcar e álcool do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pelo apoio, pela participação e colaboração no desenvolvimento dos projetos realizados durante a Pós graduação.

Aos meus companheiros de trabalho, em especial ao Bruno Miguel Monteiro dos Santos que me acompanhou na execução dos experimentos e discussão dos resultados ao longo destes dois anos e meio de trabalho.

Aos meus grandes amigos de turma pelo incentivo, apoio e pelos momentos descontraídos.

Aos meus “irmãos” “Mata-Burrense” pelos ensinamentos, amizade, companheirismo e parceria desde 2006, e principalmente, por contribuir com o meu crescimento pessoal durante os anos de ESALQ.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Fermentação alcoólica para obtenção de etanol combustível.....	17
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.3 Linhagens selecionadas de levedura.....	20
2.4 Fermentação com alta concentração de açúcar (ACA)	21
2.5 O impacto do estresse sobre a fisiologia de leveduras	22
2.6 Efeito da suplementação do mosto	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Microrganismo e inóculo.....	29
3.2 Preparo do mosto	29
3.3 Ensaio de fermentação	29
3.4 Análises físico-químicas.....	30
3.5 Cálculos	30
3.6 Análise estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Estudos de fermentação com mosto a 25° Brix.....	33
4.2 Estudos com mosto concentrado a 30° Brix.....	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	59

RESUMO

Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcares

A fermentação de mosto com alta concentração de açúcar (ACA) pode ser utilizada em escala industrial para a produção de etanol combustível. Esta tecnologia apresenta vantagens como a obtenção de níveis mais elevados de etanol e a minimização dos custos de produção, em contraposição apontam novos desafios, como minimizar os efeitos do estresse, osmótico e alcoólico, que as leveduras são submetidas. A suplementação do mosto com fontes nitrogenadas pode aumentar o rendimento de etanol durante a fermentação alcoólica, visto que este elemento desempenha importantes funções na fisiologia da levedura. Para avaliar o efeito da suplementação de mosto ACA, caldo de cana-de-açúcar concentrado a 25°, 30° e 35°Brix e suplementado com sulfato de amônio foi fermentado por linhagens comerciais de levedura, PE-2 e CAT-1, a 30°C e 60rpm e monitorado por ciclos de 24 horas. Seis ciclos fermentativos foram realizados, mediante o reciclo das células de levedura por centrifugação a 2.000 g por 15 min. Os parâmetros analisados foram o desprendimento de CO₂ obtido por avaliação da massa (pesagem em balança analítica); viabilidade celular determinada pelo método de coloração com eritrosina; teor alcoólico determinado em densímetro digital, após destilação da amostra, análise de açúcares totais e residuais por cromatografia de troca iônica e a concentração de nitrogênio assimilável determinada colorimetricamente pelo método da ninidrina, utilizando glicina como padrão. A suplementação dos meios com sulfato de amônio propiciou maiores taxas reprodutivas das leveduras, formando maior biomassa em todas as concentrações de Brix estudadas. Os valores de etanol observados foram superiores nas amostras suplementadas, atingindo um teor acima de 16% (v/v) para a linhagem CAT-1 e acima de 15,5% (v/v) para a linhagem PE-2 no mosto contendo 30°Brix. Entre as linhagens, a CAT-1 foi a que suportou melhor a pressão osmótica do meio e, conseqüentemente, apresentou produtividade fermentativa superior, atingindo uma produção acima de 5,2g/L/h. A presença da fonte de nitrogênio mostrou ser fundamental para o processo fermentativo, principalmente em mosto ACA, com concentrações mais elevadas de açúcar. A fermentação do mosto com 25°Brix não apresentou o mesmo comportamento.

Palavras-chave: Suplementação; Sulfato de amônia; ACA; *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Alcoholic fermentation of high sugar concentration wort

The fermentation of sugar cane wort with a high concentration of sugar (ACA, very high gravity) can be used on an industrial scale for the production of fuel ethanol. This technology has the advantage of achieving higher levels of ethanol and reduction of production costs, although the challenges are to minimize the effects of osmotic and alcohol stress that the yeasts are subjected. Supplementation with nitrogen sources provides important roles in the physiology of yeast and it can increase the yield of ethanol during fermentation. To evaluate the effect of supplementation of ACA wort, juice of sugar cane was concentrated at 25°, 30° and 35°Brix and supplemented with ammonium sulfate. The medium was fermented by commercial yeast strains, PE-2 and CAT-1, at 30° C, with orbital shaking. The process was followed in 24 hours cycles. Six fermentation cycles were performed with the yeast cells recycling. At the end of each cycle, the yeast biomass was separated from liquid fraction by centrifugation at 2,000 g for 15 min. Progress of fermentations was analyzed by measuring CO₂ production by evaluating the mass reduction; yeast cell viability by staining method with erythrosine; alcoholic content of distilled sample was determined by densitometry, residual sugars were analyzed by ion exchange chromatography and assimilable nitrogen concentration determined colorimetrically by ninhydrin method, using glycine as standard. The strains PE-2 and CAT-1 with ammonium sulfate reached higher reproductive rates and improved biomass at all sugar concentrations. Higher ethanol production was observed in the supplemented samples, reaching a level above 16% (v/v) for CAT-1 strain and above 15.5% (v/v) for PE-2 strain at 30° Brix concentration. CAT-1 strain showed more tolerance with the high osmotic pressure of the medium and consequently improved productivity fermentation, reaching an ethanol production above 5.2 g/L.h. Nitrogen source proved to play a crucial role in the fermentation process, mainly in ACA wort, however, the same effect was not observed at 25°Brix.

Keywords: Supplementation; Ammonium sulphate; VHG; *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hidrólise da sacarose pela enzima invertase.....	177
Figura 2 - Reações químicas da fermentação alcoólica.....	188
Figura 3 - Principais vias do metabolismo do nitrogênio em <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura 4 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO ₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 25° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem PE-2, a 30°C e 60 rpm	34
Figura 5 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO ₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 25° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem CAT-1, a 30°C e 60 rpm.....	35
Figura 6 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO ₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 30°Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem PE-2, a 30°C e 60 rpm	37
Figura 7 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO ₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 30° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem CAT-1, a 30°C e 60 rpm.....	39
Figura 8 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO ₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 35° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem PE-2, a 30°C e 60 rpm	40
Figura 9 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO ₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 35° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem CAT-1, a 30°C e 60 rpm.....	42
Figura 10 - Desprendimento de CO ₂ (g) referente ao 1° (■ ou ●) e 6° (□ ou ○) ciclos durante fermentação de mosto a 25° (A e C), 30° (B e E) e 35°Brix (C e F) pelas linhagens PE-2 (esq.) e CAT-1 (dir). Mosto sem suplementação (□) e mosto suplementado (○) com sulfato de amônio	43
Figura 11 - Desprendimento de gás carbônico durante fermentação da linhagem PE-2 nos seis ciclos fermentativos (A-F) em mosto concentrado a 30°Brix. Tratamento testemunha (sem suplementação) (■) e tratamento suplementado (○) com sulfato de amônio.....	44

Figura 12 - Desprendimento de gás carbônico da linhagem CAT-1 nos seis ciclos fermentativos (A-F) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto à 30°Brix. Tratamento testemunha (sem suplementação) (■) e tratamento suplementado (○) com sulfato de amônio..... 45

Figura 13 – Concentração de Sacarose (■), Glicose (■) e Frutose (■), no tempo inicial (T0) e após o 2°, 4° e 6° ciclos fermentativos das linhagens PE-2 (esq.) e CAT-1 (dir.) em mosto à 25° (A), 30° (B) e 35°Brix (C). Tratamento sem suplementação (C) e tratamento suplementado (S) com sulfato de amônio. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentagem de açúcar residual (%) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem PE-2 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C	48
Tabela 2 - Percentagem de açúcar residual (%) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem CAT-1 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C.....	49
Tabela 3 - Valores médios de etanol % (v/v) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem PE-2 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C.....	50
Tabela 4 - Valores médios de etanol % (v/v) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem CAT-1 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C.....	51
Tabela 5 - Consumo de açúcar (g/L), produção de etanol % (v/v), produtividade (g/L/h) e rendimento fermentativo (%) durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem PE-2 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C	53
Tabela 6 - Consumo de açúcar (g/L), produção de etanol % (v/v), produtividade (g/L/h) e rendimento fermentativo (%) durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem CAT-1 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C	54

1 INTRODUÇÃO

O mundo depende quase exclusivamente dos combustíveis fósseis para produção de energia; compostos como carvão, petróleo e gás são responsáveis por 80% da energia obtida. Os combustíveis apresentam um crescimento, no consumo anual, da ordem de 2% (média dos últimos 20 anos) e nos últimos cinco anos de 3,1% devido às economias emergentes como China e Índia; esse crescimento é alavancado pelo consumo de energia, o que faz variar os preços de maneira nunca vista. Em contraponto, uma fonte de energia que não apresente a volatilidade de preços que as fontes de origem fóssil apresentam e que possua um potencial poluente menor, desperta interesse (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2012).

O etanol, um combustível obtido pela fermentação microbiana a partir de fontes renováveis, tem sinalizado como uma opção para a demanda de energia para os próximos tempos. O Brasil produziu 23,2 bilhões de litros de álcool combustível na safra de 2012/13 (BRASIL, 2013); o estado de São Paulo produziu 51% do total de álcool produzido no país, seguido pelo estado de Goiás, com 13,5%; os outros estados produziram menos que 10% cada. O Brasil é atualmente o país líder na utilização de energia renovável em sua matriz energética (44,1%), sendo 15,7% proveniente da biomassa da cana, contra 13,3% da média mundial (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE, 2011). Atualmente, 87% dos veículos leves vendidos no país são do tipo *Flex* (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES - ANFAVEA, 2012). A tendência mundial é a incorporação desta fonte de energia em suas matrizes energéticas.

O etanol é o principal biocombustível utilizado para transporte no Brasil; o país é o maior exportador e divide a liderança de produção com os EUA (BASSO et al., 2011). Ambos são responsáveis por mais de 80% da produção mundial de etanol (UNICA, 2012). A utilização do etanol como combustível possui diversas vantagens, dentre elas a menor dependência de combustíveis fósseis importados e de suas variações de preço destes; menor emissão de poluentes (grande parte dos poluentes resultantes da queima do etanol no motor é reabsorvida no ciclo de crescimento da cana-de-açúcar e os resíduos das usinas são totalmente reaproveitados como fertilizantes na lavoura); maior geração de empregos, inclusive na zona rural; autossuficiência energética (devido à utilização do bagaço na geração de vapor); fonte geradora de divisas internacionais; favorecimento da balança comercial do país e menor impacto ambiental (FIGUEIREDO, 2008; GOLDEMBERG, 2009).

O processo industrial de produção do etanol está em constante aprimoramento. Atualmente, a “Fermentação de mosto com alta concentração (ACA)” (BAI et al., 2008;

PULIGUNDLA et al., 2011) está sendo avaliada em diferentes instâncias a fim de reduzir as necessidades de água no processo, no custo de energia, destilação e efluente, e principalmente elevar as concentrações de etanol no produto final aumentando a produtividade do processo fermentativo (BAI, 2007). Entretanto, teores elevados de açúcar no mosto provoca um aumento da pressão osmótica, que tem um efeito prejudicial sobre as células de levedura, diminuindo o crescimento e a viabilidade celular (BAFRNCOVA et al., 1999).

Estudos mostram que alterando as condições nutricionais, é possível aumentar a eficiência fermentativa, bem como a sobrevivência das células de levedura em meios com alta concentração de etanol (CASEY et al., 1984; KALMOKOFF; INGLEDEW, 1985). E, a possibilidade de se obter alta concentração de etanol no vinho se deve exclusivamente às condições de fermentação, especialmente as nutricionais. A adição de compostos como fonte de fósforo e nitrogênio é significativo para o processo de fermentação alcoólica pois gera uma maior produção de etanol (SILVA et al., 2006).

Assim sendo, a adição de nitrogênio assimilável em mosto com alta concentração de açúcar permite, mediante a tecnologia de fermentação de mostos concentrados (ACA), a produção de etanol em concentrações até então consideradas impraticáveis do ponto de vista industrial.

No entanto, as condições empregadas na maioria dos estudos realizados com ACA, diferem consideravelmente dos mostos utilizados nas instalações industriais no Brasil. No caso da produção industrial de etanol, é prática comum à reutilização de células e um tempo mínimo de fermentação. Este estudo foi conduzido de forma a aproximar as condições laboratoriais da realidade industrial, utilizando as principais linhagens comerciais como PE-2 e CAT-1, com alimentação definida durante as primeiras horas e um tempo total de 24 horas de fermentação durante seis ciclos consecutivos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da suplementação de mosto com alta concentração de açúcar com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante a fermentação alcoólica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O processo industrial de produção de etanol em larga escala é utilizado no Brasil há décadas e, por ser proveniente de fontes renováveis seu emprego como biocombustível tem gerado interesse mundial.

A partir do advento do PROALCOOL, o Brasil vem desenvolvendo tecnologias nos diversos segmentos da indústria sucro-alcooleira, com ganhos expressivos em rendimento e em eficiência, contribuindo para que o país apresente o menor custo de produção do etanol, quando comparado com os demais produtores (GOLDEMBERG; MACEDO, 1994). As contribuições ocorreram tanto no campo, com melhores variedades de cana e práticas agrícolas, quanto na área industrial, com melhorias na engenharia do processo, assepsia na fermentação e seleção de linhagens mais resistentes (BASSO et al., 2008).

2.1 Fermentação alcoólica para obtenção de etanol combustível

O processo fermentativo por leveduras, para obtenção de etanol, é conhecido e amplamente utilizado. É realizado principalmente pela *Saccharomyces cerevisiae*, onde em condições anaeróbias os açúcares como a glicose e a frutose (que são oriundos do caldo de cana-de-açúcar ou proveniente da hidrólise da sacarose (Figura 1)) são convertidos, por processo denominado glicólise, em energia celular (ATP) produzindo o ácido pirúvico. (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Figura 1 – Hidrólise da sacarose pela enzima invertase (TORRES et al., 1999)

A partir do piruvato, as reações podem ser divididas em duas etapas (Figura 2): A) o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído; a enzima piruvato descarboxilase depende da ação da tiamina pirofosfato, uma coenzima firmemente ligada a Mg^{2+} . B) A segunda etapa ocorre sob a ação da enzima álcool desidrogenase, onde o acetaldeído é reduzido pela NADH a etanol. Todas estas reações são realizadas pela levedura para ganho de energia em condições de

anaerobiose, sendo, portanto o etanol e dióxido de carbono considerados resíduos metabólicos formados neste processo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

Figura 2 - Reações químicas da fermentação alcoólica (VOET et al., 2000)

Tecnicamente, o etanol pode ser produzido a partir de uma ampla variedade de matérias-primas renováveis, no entanto a cana de açúcar, beterraba e sorgo sacarino fornecem os açúcares, sacarose, glicose e frutose, que podem ser facilmente fermentados por leveduras (AMORIM et al., 2009). Isso difere dos processos de produção de etanol com base em amido ou matéria-prima lignocelulósica, que exigem prévia hidrólise dos polissacarídeos, o que aumenta os custos de produção de etanol (DIEN, BOTHAST, 2009). Além disso, o rendimento da cana-de-açúcar por hectare é maior que a do milho, permitindo obter 80 litros de etanol por tonelada de cana (WEINGRILL, 2007).

A produção de etanol no Brasil é derivada, em escala industrial, exclusivamente da cana-de-açúcar, cujo cultivo é favorecido pelo clima resultando em matéria prima de menor custo (ANDRIETTA et al., 2006).

O processo fermentativo industrial é conduzido no Brasil de forma descontínua, ou contínua. Segundo Amorim e Leão (2005), 85% das destilarias brasileiras operam com processo descontínuo, e apenas 15% no sistema contínuo. O sistema descontínuo conhecido como MELLE-BOINOT é o mais importante e responsável por grandes avanços tecnológicos. Neste processo a fermentação é iniciada com a inoculação do pé de cuba nas dornas, sendo o mosto alimentado com uma vazão definida, de modo a minimizar os efeitos de inibição pela alta concentração de açúcar no substrato (FERREIRA, 2008). A fermentação ocorre durante a alimentação da dorna, em torno de 4 a 5 horas, e continua após o término da adição, quando o nível da dorna está completo. Após o final da fermentação, o mosto fermentado é centrifugado, separando o creme de levedura do sobrenadante. O primeiro será tratado e retorna ao processo com a adição de novo mosto, enquanto que o sobrenadante, denominado de vinho, é enviado para a coluna de destilação (FERREIRA, 2008).

A reutilização celular reduz a necessidade de propagação de levedura, e menos açúcar é desviado para a formação de biomassa. Até 90-95% das células de levedura são reciclados,

resultando em altas densidades celulares dentro do fermentador de (10 a 14%, peso úmido/vol). Estima-se que a biomassa de levedura aumenta 5 a 10% (em relação à biomassa inicial) durante um ciclo de fermentação, o qual é suficiente para substituir as células de levedura perdidas durante a fase de centrifugação. Esta biomassa elevada de levedura no interior do fermentador é responsável por um tempo muito curto de fermentação (AMORIM et al., 2004; ANDRIETTA et al., 2002; LALUCE, 1991; LIMA et al., 2001).

No Brasil, a utilização eficiente da sacarose é uma preocupação das indústrias produtoras de etanol, que visam melhorar a eficiência da fermentação (aprimorar o processo de conversão de biomassa em etanol combustível) (BASSO et al., 2008, SOUZA et al., 2007).

Neste sentido, diversos estudos na área de engenharia bioquímica têm sido realizados com diversas linhagens, principalmente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A manipulação do genoma deste gênero pode permitir a criação de uma nova geração de organismos industriais, idealmente adequada para tolerar os vários estresses impostos pelos processos fermentativos (ARGUESO et al., 2009).

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Entre diversos microrganismos produtores de etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* permanece como a principal espécie e se destaca como uma excelente produtora de etanol (BAI et al., 2008; MA; LIU, 2010). A levedura *S. cerevisiae* é a mais adequada, devido sua capacidade fermentativa, capacidade de converter os açúcares rapidamente em etanol, tolerância a variações de temperatura e atividade celular em ambiente ácido (ANDRIETTA et al., 2006; 2007).

Mussatto et al. (2010) ressalta a importância das espécies de *Saccharomyces* para o processo industrial devido a tolerância elevada para o etanol e outros inibidores (formados durante o pré-tratamento da matéria-prima ou produzido durante a fermentação) e a capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbias que são caracteristicamente estabelecidas em reatores de fermentação de larga escala.

Atualmente, algumas ferramentas e técnicas vêm sendo utilizadas com objetivo na fermentação a fim de melhorar o desempenho fermentativo e as linhagens presentes em ambientes específicos de processos de fermentação industrial, principalmente estudos baseado na imobilização de células (MUSSATTO et al., 2010). A utilização de linhagens de leveduras selecionadas por técnicas de cariotipagem têm revelado aumento significativo na produtividade e no rendimento da fermentação e menor custos de produção (BASSO et al., 2008; BLIECK et al., 2007).

2.3 Linhagens selecionadas de levedura

Diferenças substanciais de adaptação e metabolismo entre linhagens de *S. cerevisiae* justificam a seleção de linhagens mais apropriadas para o ambiente da fermentação alcoólica industrial.

Os processos de fermentação industrial sob condições severas, especialmente usando meio ACA, necessitam de linhagens industriais “robustas” (SILVA et al., 2005). Essas cepas respondem rapidamente às condições de estresse, ajustando suas atividades metabólicas e se adaptando por um longo período de tempo neste ambiente (ZHAO; BAI, 2009).

As linhagens devem ser resistentes às tensões múltiplas encontradas no processo, incluindo o estresse osmótico, devido a altas concentrações de açúcar no início, o estresse alcoólico, devido ao elevado teor de etanol no final da fermentação, às condições anaeróbicas estabelecidos nos biorreatores e ao procedimento de reciclagem de células para a utilização da biomassa de levedura nos vários ciclos consecutivos da fermentação (MUSSATO et al., 2010).

Atualmente, diversas unidades produtoras de etanol, estão fornecendo leveduras isoladas de seus processos, durante o período de safra. Estas leveduras foram denominadas como SA-1 (proveniente da usina Santa Adélia), BG-1 (usina Barra Grande), CAT-1 (usina Virgolino de Oliveira, Catanduva-SP) e PE-2 (usina da Pedra) (AMORIM, 2005; BASSO et al., 2008). As linhagens após isolamento foram caracterizadas por cariotipagem, técnica que permite distinguir quais são as leveduras presentes no processo e que apresentaram melhor desempenho (LOPES, 2012).

Algumas destas linhagens (CAT-1 e PE-2) apresentam históricos de 14 a 19 anos de utilização com capacidade de implantação em processos industriais, abrangendo diferentes destilarias, diversos processos, regiões e safras. Além de rendimento elevado em etanol, pouca formação de glicerol, manutenção de viabilidade durante os ciclos fermentativos e elevados teores celulares de glicogênio e trealose, também apresentam pouca formação de espuma e ausência de floculação (BASSO et al., 2008). O glicogênio e a trealose são carboidratos de reserva e estão envolvidos na proteção das células quanto aos estresses ocasionada pelo meio. O glicogênio é fonte de energia em condições de limitação de açúcar (ALVES, 1994), enquanto que a trealose está associada tanto à proteção das enzimas glicolíticas contra a desnaturação em situação de estresse, como também mantendo a integridade e a permeabilidade da membrana plasmática (PANEK, 1995).

Em estudo realizado por Ferreira (2008), comparando linhagens selecionadas de levedura e uma linhagem de levedura de panificação, não foi observado diferença entre as

linhagens selecionadas (PE-2 e CAT-1), com rendimento percentual em torno de 91%, e a levedura de panificação, para produção de etanol, que obteve rendimento de 88%. Por outro lado, a viabilidade celular, permaneceu acima de 90% para as linhagens selecionadas contra 61% para a levedura de panificação.

Devido a estas características, as linhagens CAT-1 e PE-2 são as mais utilizadas em processos industriais, o que representa atualmente 80% de levedura ativa seca comercializada para produção de etanol no Brasil. Elas são utilizadas, anualmente, em mais de 200 destilarias, sendo responsáveis por 60% da produção total de etanol no país (BASSO et al., 2011).

2.4 Fermentação com alta concentração de açúcar (ACA)

Em paralelo ao melhoramento das linhagens de leveduras, o desenvolvimento tecnológico realizado no processo é essencial para estabelecer sistemas de produção de etanol altamente eficientes. Entre os desenvolvimentos mais significativos no campo da fermentação, está a aplicação da tecnologia com alta concentração de açúcar (ACA) (MUSSATTO et al., 2010). Os processos industriais de produção de etanol, com altas concentrações apresentam importantes ressaltadas no âmbito energético, econômico e ambiental.

No Brasil, o processo industrial utiliza o caldo de cana e o melaço, resíduo da produção de açúcar, que podem misturados antes da fermentação ou utilizados separadamente (BASSO et al., 2008).

Com vistas à melhoria da eficiência do processo na década de 1980, foram iniciados estudos de fermentação de caldo com alta concentração de 18-22% (p/v) onde se obtinha vinhos com uma concentração de 10-12% (v/v) de etanol. Na década seguinte, as pesquisas indicaram que as leveduras poderiam suportar concentrações elevadas de etanol, assim, caldos mais concentrados poderiam ser utilizados originando vinhos com uma concentração de álcool superior a 15% (v/v). Nos processos com obtenção elevada de etanol os custos são reduzidos porque cerca de 30% dos custos do processo de produção estão situados na etapa de destilação, a utilização de menor quantidade de vapor utiliza menos água, bem com uma menor produção de vinhaça (PULIGUNDLA et al., 2011). Uma diminuição de cerca de 4% de energia foi relatado quando as concentrações finais de etanol aumentaram de 12 para 18%, em condições de fermentação com alta concentração de açúcar (BELCHER, 2005).

Outra vantagem da utilização desta tecnologia é o fato de que como o caldo teria uma concentração superior de etanol, isto provocaria um efeito repressor sobre as bactérias e com isto permitiria reduzir a utilização de antibióticos (THOMAS et al., 1996).

No entanto, a grande limitação da aplicação da tecnologia ACA são as características das leveduras utilizadas atualmente, que possuem limitada tolerância aos estresses. As leveduras industriais atuais são submetidas a concentrações menores de açúcares, e conseqüentemente a menores concentrações de etanol (8,0% a 9,0%) (BASSO et al., 2003, 2008; PIDDOCKE et al., 2009).

Com intuito de otimizar a fermentação com alta concentração de açúcares e produção de etanol (13% a 16%, v/v), vários estudos têm buscado selecionar linhagens capazes de suportar fermentações com elevados teores alcoólicos, seja para a produção de cerveja (HUUSKONEN et al., 2010) ou álcool (ORTIZ-ZAMORA et al., 2009; STANLEY et al., 2010).

Recentemente, estudos indicaram a possibilidade de fermentação utilizando ACA para a produção de vinhos com altos níveis de etanol (PEREIRA et al., 2010a, 2010b, 2012). Em particular, os trabalhos de Pereira et al. (2010, 2011) avaliaram linhagens de *S. cerevisiae*, provenientes de processos industriais brasileiros de produção de etanol e de cachaça, para fermentação com alto teor açúcar, incluindo a PE-2, que se destacou em ambos os trabalhos.

Entretanto, ainda são necessários estudos mais detalhados, na busca de alternativas que minimizem o estresse ocasionado nestas condições de fermentação e produção de etanol.

2.5 O impacto do estresse sobre a fisiologia de leveduras

Como citado anteriormente, as leveduras utilizadas nos processos industriais encontram várias condições de estresse sequencial ou simultâneos impostos pelo próprio processo, tais como: níveis elevado de etanol e pressão osmótica, pH baixo, temperatura elevada, e muitos outros, todos estes intensificados pela prática da reciclagem de células (BASSO et al., 2011).

Etanol

O elevado de etanol no fim de cada ciclo de fermentação (8-12%, v/v), é um dos principais fatores de estresse que atuam sobre as leveduras. O álcool retarda o crescimento da levedura, reduz a viabilidade, a habilidade fermentativa e desencadeia uma fermentação incompleta (FERREIRA, 2002). O papel inibitório do etanol sobre a *S. cerevisiae* não está completamente esclarecido. Mesmo assim, o alvo principal do etanol é considerado a

membrana citoplasmática das células de levedura (ALEXANDRE et al., 2001; THOMAS et al., 1978).

A fluidez da membrana, que está relacionada com a sua composição lipídica, é profundamente alterada, na presença de etanol, e, como resultado, a permeabilidade da membrana para alguns íons (especialmente os íons de H^+) é significativamente afetada. Isto provoca uma dissipação do gradiente eletroquímico através da membrana, que por sua vez afeta a formação e manutenção da força motriz de prótons com subsequente diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana de levedura, a presença de alta concentração de etanol no final da fermentação provoca outros efeitos sobre a fisiologia das leveduras, incluindo a inibição do crescimento e inativação enzimática, o que leva a diminuição da viabilidade celular (BANAT et al., 1998)

A reutilização de células de levedura (por reciclo) acentua esta condição de estresse para as linhagens industriais. As células de levedura devem manter alta viabilidade no final de cada ciclo de fermentação a fim de ser capaz serem capazes de executar o próximo ciclo. É por isso que uma determinada cepa pode ter um desempenho eficiente em um ciclo de fermentativo, com teor de etanol final de 18% (v/v), e nos ciclos subsequentes não apresentar o mesmo desempenho. No entanto, se a condição fisiológica da levedura garantir a vitalidade das células no final da fermentação, teores mais elevados de etanol podem ser facilmente alcançadas. Isto foi observado em alguns processos de fermentação de milho e à base de cereais, em que 17 a 23% (v/v) de etanol foram obtidos utilizando “blends” (BAYROCK; INGLEDEW, 2001; JONES et al., 1994).

Além dos efeitos citados, algumas enzimas, como a álcool desidrogenase e hexoquinase, e algumas proteínas da membrana, como a ATPase, responsável por criar gradiente eletroquímico, captando nutrientes e regulando o pH do interior da célula, têm a sua função reduzida devido ao aumento do etanol (BAI et al., 2008; DUFOUR; GOFFEAU, 1980; PIPER, 1995).

Embora com restrições ao processo, elevadas concentrações de etanol são desejáveis no final da fermentação, a fim de reduzir o consumo de água e os custos de energia durante a destilação. Espera-se, ainda, que esta condição de fermentação favoreça o balanço energético do etanol produzido e melhore a sustentabilidade do processo industrial. No entanto, o teor final de etanol na maioria das destilarias ainda é limitado devido à tolerância das linhagens às altas concentrações de etanol. Adicionalmente, o estresse alcoólico pode ser intensificado por altas temperaturas e alta acidez. Todos estes fatores são impostos simultaneamente ou sequencialmente às leveduras de processos industriais (DORTA et al., 2006).

Pressão osmótica

A pressão osmótica é a força com a qual um solvente se desloca de um meio mais concentrado para outro menos concentrado, através de uma membrana semipermeável até obter o equilíbrio. A membrana citoplasmática é altamente afetada por este fator de estresse, altas; pressões osmóticas tendem a desestabilizar o equilíbrio composicional interno da célula dos organismos que garantem as funções celulares estáveis (homeostase celular) (JOHN et al., 2012).

A primeira consequência quando a célula é exposta às condições de estresse osmótico, é a perda de água pela sua migração do interior da célula para o exterior, fazendo com que a membrana citoplasmática sofra um turgor (MAGER et al., 2002).

Este fator de estresse age de forma sinérgica com o etanol, aumentando o poder tóxico do mesmo e como consequência reduzindo a viabilidade da célula. Como resultando a célula interrompe o seu crescimento. Pressão osmótica elevada do meio pode aumentar a toxicidade do ácido láctico, que inibe o crescimento de *S. cerevisiae* (GRAVES et al., 2006; NGANG et al., 1989)

Não obstante, as células possuem a capacidade de osmorregulação, que é o controle ativo do balanço hídrico e da homeostase celular que são cruciais à vida. Em *S. cerevisiae*, o sistema osmorregulatório é bem compreendido. A célula responde ao estresse hiperosmótico primeiramente reprimindo seu crescimento, depois ocorre o acúmulo de glicerol no interior celular com o objetivo de recuperar a turgescência. Isso ocorre pela prevenção do fluxo do glicerol e pelo aumento da sua síntese pela ativação de uma rota sinalizadora conhecida como rota de alta osmolaridade do glicerol ou HOG em inglês (*high-osmolarity glicerol*). O glicerol desempenha o papel central na adaptação celular ao estresse osmótico (MAGER et al., 2002).

Em fermentações com mosto de até 31% de sólidos dissolvidos, o efeito inibitório da elevada pressão osmótica e do elevado teor de etanol produzido sobre a viabilidade da levedura pode ser superado pela suplementação do meio com nitrogênio, ergosterol e ácido oléico. A razão para isso não decorreu do aumento da tolerância da levedura, mas sim da duração do tempo e da quantidade da síntese de massa celular (CASEY et al., 1984).

Ainda, diversos autores sugerem que alterando as condições nutricionais, aumenta a eficiência fermentativa, bem como a sobrevivência das células de levedura em meios com alta concentração de etanol (CASEY et al., 1984; KALMOKOFF; INGLEDEW, 1985; SANTOS et al., 2011). E, esta possibilidade de se obter alta concentração de etanol no vinho se deve exclusivamente às condições de fermentação, especialmente as nutricionais. Pode-se afirmar

que a adição de fontes de fósforo e nitrogênio é importante para o processo de fermentação alcoólica (maior produção de etanol) (SILVA et al., 2006).

2.6 Efeito da suplementação do mosto

A principal fonte de utilização do nitrogênio pela levedura *S. cerevisiae* é a forma amoniacal (NH_4^+). Na ausência desta, a levedura procura outras formas como amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos), não tendo habilidade metabólica para aproveitar o nitrato e com pouquíssima capacidade de utilizar as proteínas do meio (ROITMAM et al, 1988, BASSO; AMORIM, 2001). O transporte de compostos nitrogenados em *Saccharomyces* é um processo complexo, que envolve um grande número de transportadores e de substratos que são estruturalmente diferentes. O transporte do íon amônio, assim como no caso de aminoácidos e peptídeos, é um processo ativo secundário e indicam a existência de três permeases para o íon amônio, codificadas respectivamente, pelos genes *MEP1*, *MEP2* e *MEP3*, sendo o *MEP2* o que apresentou ter maior afinidade com o íon NH_4^+ (CRUZ et al., 2001).

Estudo realizado por Cruz et al. (2001) sugerem a existência do transporte ativo de metilamônio nos meios suplementados com sulfato de amônio e peptona e não no meio contendo fonte de nitrogênio onde existe a predominância de aminoácidos na forma livre.

Uma vez, dentro das células, os compostos nitrogenados são sintetizados a partir de qualquer glutamato ou glutamina, que parece ser o destino final dos grupos amino utilizados nos processos biossintéticos. A principal via para a síntese do glutamato é através da combinação de amônio + NADPH com α -cetoglutarato, o qual é proveniente do ciclo do ácido cítrico a partir da síntese de acetil-CoA e oxaloacetato. A glutamina, por sua vez, é sintetizada pela combinação de amônio + ATP com o glutamato (MAGASANIK; KAISER, 2004). As vias para a utilização de uma variedade de fontes de nitrogênio, incluindo ureia, prolina e arginina, estão apresentadas na Figura 3. O gene de *S. cerevisiae* para cada um dos passos enzimáticos é designada em *itálico* (MAGASANIK; KAISER, 2004).

Figura 3 - Principais vias do metabolismo do nitrogênio em *S. cerevisiae* (MAGASANIK; KAISER, 2004)

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

Os mostos, para a produção de álcool combustível, de todos os cereais, incluindo milho e trigo, são deficientes em nitrogênio assimilável (INGLEDEW, 2005). O autor sugere que a composição do meio é a resposta para a maioria das fermentações lentas ou interrompidas precocemente, de mostos provenientes de matérias-primas amiláceas ou sacarinas. A adequada nutrição das células de levedura as torna aptas a resistir às condições de estresse causadas por ácidos orgânicos, temperatura, pH, etanol e outros fatores ambientais.

A diversidade dos compostos nitrogenados, assim como, as quantidades apropriadas são relevantes para que a fermentação seja completa e para a qualidade do produto em processos industriais (CASEY et al., 1984; STEWART et al., 1998). Deficiências de nitrogênio são uma das principais causas de fermentações lentas ou estagnadas (ALEXANDRE et al., 1998; BISSON et al., 1999). Diversos trabalhos têm demonstrado que em meio contendo sacarose, maltose, glicose ou frutose a suplementação com uma fonte de nitrogênio induziu a acumulação de maior biomassa e etanol (BATISTOTE et al., 2006; CRUZ et al., 2002; MIRANDA JUNIOR et al., 2008, 2009).

Segundo Amorin e Leão (2005), a quantidade recomendada para a fermentação alcoólica é de 100 a 300 mg de Nitrogênio livre (NH₄⁺ e R-NH₂) por litro de mosto.

Cruz et al. (2002) comparando diferentes estruturas de fontes nitrogenadas obtiveram resultados melhores com fontes mais complexas, tais como a peptona. Os autores sugerem que não apenas a complexidade estrutural da fonte de nitrogênio em combinação com a fonte de carbono pode interferir com o metabolismo da levedura, mas também pequenas diferenças bioquímicas entre as linhagens de levedura pode ter um efeito acentuado sobre o desempenho da fermentação.

A suplementação de mosto de trigo a 35°Brix com íons amônio (mistura de 12mM de fosfato de amônio monobásico e sulfato de amônio) apresentou resultados similares comparados com a adição de 1% (m/v) de extrato de levedura e 16mM de ureia em termos de tempo de fermentação e de eficiência fermentativa. A fermentação, a 20°C, finalizou em 5 dias, atingindo concentração de 19,7% (v/v) de etanol no vinho (JONES; INGLEDEW, 1994).

Um teor de 14,8% de etanol (v/v) foi relatado por Thomas et al. (1994) a partir da fermentação do melaço de cana como único substrato em condições de ACA (477 g/L). A adição de 20 mM fosfato de diamônio melhorou a produção de etanol. Neste mesmo estudo, a fermentação do caldo de cana enriquecido com melaço com (34-35% p/v) de açúcares à 30°C produziu 15,8% (v/v) de etanol em 48h.

A adição de fontes de FAN (*free amino nitrogen*) tais como sais de amônio leva a concentrações mais elevadas de etanol final nos meios ACA fermentados (SRICHUWONG et al., 2009; SRIKANTA et al., 2006). Theerarattananoon et al. (2008) ao suplementar o meio ACA com uréia (0,96g/L) e reduzindo a temperatura para 25°C sugeriu que a ureia não somente equilibra a deficiência de nitrogênio durante a fermentação, mas também prolonga a fase logarítmica de *S. cerevisiae*, resultando em rendimento maior de etanol.

Pereira (2007) estudou a suplementação de diferentes fontes e concentrações de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica na produção de cachaça, cerveja e vinho e concluiu que o maior rendimento da fermentação foi obtido pela linhagem de levedura de baixa fermentação na presença de sulfato de amônio (5g/L) como fonte de nitrogênio.

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

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

Breisha (2010) relatou que a adição de sulfato de amônio, em dose de 5 mg por grama de sacarose consumida produziu concentração de etanol de 11,55% (v/v), com o consumo completo da sacarose (250g/L) adicionada, após 48 horas de fermentação. A adição de extrato de levedura em quantidade de (6 g/L) em conjunto com a tiamina (0,2 g /L obteve) proporcionou uma produção de etanol de 14% (v/v) em meio contendo 300g/L de sacarose e 16% (v/v) em meio com 350g/L de sacarose. No entanto, para esta última concentração foi utilizado um reator, durante as primeiras 12h com adição de ar de 150 dm³ min⁻¹. O rendimento fermentativo foi de 71,4, 72,1 e 70,6% para as respectivas concentrações.

A fermentação de ACA em sistema descontínuo utilizando a linhagem industrial PE-2 foi realizada com sucesso durante 15 ciclos de fermentações consecutivas. Nos cinco primeiros ciclos fermentativos, quase todo o açúcar foi consumido (resíduo < 17 g/L) permitindo atingir níveis de etanol em torno de 17% (v/v) com um rendimento fermentativo que variou de 78-82% e produtividade entre 3,45 - 4,59 g/L.h (PEREIRA et al., 2012).

Pereira et al. (2010a) desenvolveram um meio (g/ L: CSL (Licor de Milho) 44,3, uréia 2,3, MgSO₄·7H₂O 3,8 e CuSO₄·5H₂O 0,03) para fermentações alcoólicas com ACA. Neste meio, a linhagem industrial PE-2 foi capaz de fermentar em concentração de 330 g/L de glicose produzindo 18,6% (v/v) de etanol e eficiência fermentativa acima de 90% em menos de 100h de fermentação.

Assim, a adição de nitrogênio assimilável em mostos com alta concentração de açúcares permite, a produção de etanol em concentrações até então consideradas impraticáveis sob condições de exploração industrial.

No entanto, as condições empregadas na maioria dos estudos realizados com ACA, diferem consideravelmente dos utilizados nas instalações de produção, no Brasil. No caso da produção de etanol, é prática comum a reutilização de células em menor tempo de fermentação. Este estudo foi conduzido de forma a aproximar mais as condições laboratoriais da realidade industrial, com alimentação semelhante ao processo fermentativo MELLE-BONIT durante seis ciclos consecutivos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da suplementação de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ em mosto com alta concentração de açúcar para produção de etanol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas da Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, USP.

3.1 Microrganismo e inóculo

As leveduras PE-2, CAT-1 (LNF, Bento Gonçalves/RS) foram utilizadas neste trabalho. Estas são algumas das leveduras mais empregadas em fermentações alcoólicas industriais no Brasil (BASSO et al., 2008).

Para ambas as leveduras foram realizados ensaios com e sem adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como suplemento nitrogenado, na concentração final de 24mM.

Três gramas da levedura liofilizada foram hidratadas com 20 mL de H_2O a 30°C, 70 rpm por 15 minutos. Após centrifugação (Damon/ IEC PA - 6000) a 2000g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células utilizadas como inóculo.

3.2 Preparo do mosto

O caldo de cana-de-açúcar foi extraído em moenda, filtrado em algodão para retirada de bagacilhos, aquecido até ebulição, resfriado e novamente filtrado em algodão para remoção dos resíduos formados durante o aquecimento do caldo (borras).

O ajuste do teor de sólidos solúveis do caldo tratado foi realizado mediante evaporação com aquecimento direto em chama. Foram preparados caldos com 25, 30 e 35° Brix e armazenadas em galão de 10L a 10°C para posterior utilização.

3.3 Ensaio de fermentação

Com o intuito de simular a fermentação e a alimentação do processo realizado nas indústrias, após o preparo do inóculo, 20 mL de mosto foram adicionados aos tubos de centrífuga a cada hora, durante 5 horas até completar o volume final de 100 mL de mosto. Cada mosto continha a concentração desejada de sólidos solúveis (Tratamento 1 25°Brix; T2 30°Brix ou T3 35°Brix).

Os tubos (T1, T2 e T3) foram incubados a 30°C, sob agitação de 60 rpm em incubadora tipo shaker (New Brunswick Scientific CO, US), desde a primeira adição do caldo nos tubos e permaneceu incubado durante um ciclo de 24h. O desprendimento de CO_2 foi monitorado periodicamente, mediante pesagens em balança (Tecnal, modelo B-TEC-4100, BR), para o acompanhamento do andamento da fermentação. Foram realizados seis ciclos fermentativos consecutivos.

No final de cada ciclo, a fração líquida foi separada por centrifugação (Damon IEC PA-6000) a 2000g por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a - 4°C para as análises físico-químicas posteriores.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 Análises físico-químicas

O desprendimento de CO₂ foi acompanhado, durante as oito primeiras horas de fermentação e no final de 24h, mediante pesagem. A massa úmida (biomassa) foi analisada, no final de cada ciclo fermentativo, por pesagem após a centrifugação.

A viabilidade celular da levedura, determinada pelo método da coloração com eritrosina (CALDAS, 1998), foi analisada após a hidratação das células (“pé de cuba”) e no final de cada ciclo de fermentação.

A concentração de etanol do vinho foi determinada por densitometria em densímetro digital (Anton Paar DMA 4500), após destilação das amostras por arraste de vapor em destilador (Tecnal TE-012) e a concentração de nitrogênio assimilável (NA) do caldo e do vinho foi determinada colorimetricamente (SPEKOL 1300) pelo método da ninidrina (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 1987; adaptado por ABERNATHY et al., 2009), utilizando glicina como padrão.

A concentração de sacarose, glicose e frutose no caldo foram determinadas por cromatografia de troca iônica DIONEX (modelo DX300; Sunnyvale, CA, USA) equipado com coluna Carbowack PA-1 e utilizando como fase móvel NaOH (100 mmol.L⁻¹) sob fluxo de 0,9 ml.min⁻¹. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em membrana 0,22µm.

3.5 Cálculos

O **consumo de nitrogênio** foi obtido pela diferença entre a concentração no tempo inicial e tempo final.

O **rendimento alcoólico** foi calculado considerando o teor alcoólico e o total de açúcar consumido após o final da fermentação conforme a equação de Gay –Lussac:

onde, 180g de glicose origina 92g de etanol, assim, 100g de açúcar produzem 51,11g de etanol ou 64,75 mL de etanol.

A **produtividade** em etanol foi obtido considerando o valor observado de etanol (% , g/100mL) dividido pelo tempo total de fermentação (h).

3.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e Testes de Tukey, Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS (Statistical Analysis System, Version 9.1).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com as leveduras PE-2 e CAT-1 em mosto com alta concentração de açúcar (ACA) estão apresentados conforme a concentração de sólidos solúveis.

4.1 Estudos de fermentação com mosto a 25° Brix

Mosto concentrado a 25°Brix contém em torno de 25% de açúcares redutores totais (ART), o que durante a fermentação pode ser produzir até 16,2% (v/v) de etanol. Os experimentos realizados com mosto a 25°Brix, de modo geral, ocasionaram impacto nos aspectos fermentativos, devido à pressão osmótica, com produção de no máximo 14% (v/v) de etanol em seis ciclos.

A suplementação do mosto com sulfato de amônio propiciou produção de biomassa maior quando comparada com o ensaio sem suplementação (testemunha). A biomassa da linhagem PE-2 no tempo inicial (Figura 4A), isto é, após a hidratação das células, ficou em torno de 7% de massa úmida, com aumento similar para ambos os ensaios até o 2° ciclo. A partir do 3° ciclo, a suplementação apresentou maior produção de biomassa atingindo 13% (4° ciclo) e 18% (6° ciclo), enquanto o mosto sem suplementação a biomassa obtida foi de 13,2% no 6° ciclo. A diferença de 5% em termos de biomassa, é consequência da suplementação nitrogenada, que permitiu que as células de leveduras utilizassem acima de 100 mg /L de N livre (Figura 4F) para a realização de suas funções vitais.

A concentração de açúcar residual no mosto nas amostras suplementadas foi menor que 1 g/L (Figura 4C), sugerindo que praticamente todo açúcar foi convertido em etanol e biomassa. Em contrapartida, a alta densidade celular /volume de mosto formado nas amostras suplementadas pode ter sido a causa dos demais parâmetros fermentativos serem semelhantes para ambos os ensaios, com e sem suplementação do mosto, mantendo a viabilidade celular, etanol e o desprendimento de CO₂ após 24h. O consumo maior de açúcar e nitrogênio no tratamento suplementado pode ter sido utilizado para a produção de biomassa.

A produção de etanol para o mosto contendo 25°Brix não apresentou diferença entre o mosto suplementado e testemunha, exceto no primeiro ciclo onde foram obtidos 11,1 % (v/v) e 9,88% (v/v), respectivamente. Nos demais ciclos, os teores de etanol obtidos pela PE-2 se mantiveram próximos a 14%, para os dois tratamentos. Valores próximos a este foram encontrados por Basso et al. (2003) para a mesma linhagem.

Figura 4 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 25° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem PE-2, a 30°C e 60 rpm

A linhagem CAT-1, quando submetida a concentração de 25°Brix, apresentou comportamento semelhante a linhagem PE-2 para todos os parâmetros fermentativos. A análise dos resultados aponta uma produção maior que 3% de biomassa para as amostras suplementadas, atingindo o valor de 15,6 % de massa úmida contra 12,1% das amostras não suplementadas, no final do 6º ciclo (Figura 5A). A diferenciação também ocorreu após o 2º ciclo.

O consumo de nitrogênio quando comparado com a PE-2 foi relativamente menor, não ultrapassando os 100 mg nitrogênio / L para as amostras suplementadas e os 40 mg N / L para as amostras não suplementadas. No entanto, a diferença de consumo entre os ensaios corresponde à diferença obtida quanto à biomassa, o que reforça a importância do nitrogênio

livre na fisiologia das leveduras e para a manutenção e reprodução das células (PULIGUNDLA et al., 2011; THOMAS; INGLEDEW 1990).

A produção de etanol no 1º ciclo para as amostras suplementadas atingiu em média 12,6% (v/v) que coincide com o pico de 93% de consumo de nitrogênio contra a média de 10,7% (v/v) e um consumo de apenas 31% para as amostras sem suplementação. Uma diferença de quase 2% (v/v) de etanol ocorreu entre os ensaios, mas que, igualmente a PE-2, do 3º ciclo em diante ocorre o comportamento inverso, sendo a maior produção média para CAT-1 sem suplementação no 3º ciclo resultando em 15,2% (v/v) de etanol. Nesta concentração de açúcares já foi possível a obtenção de valores acima de 15% de etanol, como descreve Li et al. (2009).

Figura 5 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 25° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem CAT-1, a 30°C e 60 rpm

4.2 Estudos com mosto concentrado a 30° Brix

As leveduras quando submetidas à fermentação de mosto com concentração de 300 g/L de sólidos solúveis sofre um impacto sobre os parâmetros fermentativos devido à alta pressão osmótica e consequentemente a pressão alcoólica. O nitrogênio, por sua vez, passa a ter um papel decisivo para o desempenho das leveduras, assim como verificado por Puligundla e Reddy (2010) que trabalharam com 30° a 34°Brix.

Nos experimentos com mosto contendo 30°Brix, o consumo de açúcar no 2° ciclo foi em torno de 230 g/L nas amostras suplementadas e 204 g/L nas amostras sem adição de sulfato de amônio após 24h de fermentação (Figura 6C). No final do sexto ciclo a diferença de açúcar residual entre os tratamentos diminuiu. O mosto suplementado apresentou concentração de 58,2 g/L e o testemunha de 65,3 g/L de açúcares.

A produção de biomassa (Figura 6A) atingiu no final do 6° ciclo os valores médios de 13,5 g e 11,6 g nas amostras suplementadas e testemunha, respectivamente. A diferença de quase 2% na massa úmida é menor quando comparado com a diferença encontrada em meio de 25° Brix para a mesma linhagem. No entanto, é altamente positivo, no sentido de que a densidade celular / volume de mosto não chega a limitar a fermentação alcoólica e a viabilidade celular.

O consumo de nitrogênio (Figura 6F) acima de 100 mg/L nos primeiros ciclos proporcionou viabilidade celular em torno de 5% maior do que nas amostras sem suplementação e garantiram altos valores de etanol, atingindo acima de 14% (v/v) no 2° ciclo e o valor máximo de 15,5% (v/v) no final do 5° ciclo (Figura 6B). A diferença de etanol entre os ensaios só não foi significativa no 4° ciclo, em que houve queda da viabilidade devido ao estresse alcoólico ocasionado nos ciclos anteriores (HALLSWORTH, 1998; MARTINI et al., 2004).

A linhagem PE-2 quando em meio suplementado manteve a viabilidade crescente nos últimos ciclos diferentemente da PE-2 no tratamento testemunha (Figura 6D). Esta viabilidade foi acompanhada por um maior consumo de nitrogênio pela levedura, o mesmo foi observado por Cruz et al. (2002).

Figura 6 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO_2 (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 30°Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem PE-2, a 30°C e 60 rpm

O comportamento da linhagem CAT-1 nos ensaios realizados em condições de 300g/L de açúcares pode ser compreendida, analisando a quantidade de CO_2 liberada (Figura 7E). O desprendimento de 11,4 g no 1° ciclo e o de 14,2 g de CO_2 no 2° ciclo, das amostras suplementadas com sulfato de amônio, foi responsável pela produção média de 12,4% (v/v) e 16% (v/v) de etanol, respectivamente. A quantidade de CO_2 liberada acima de 14 g foi alcançada com a levedura CAT-1 nas condições de 300 g/L de açúcares, sendo a maior liberação no 6° ciclo que atingiu 15,9 g em 24 horas de fermentação. Este fato sugere que mesmo após seis ciclos fermentativos, a linhagem CAT suplementada manteve alta produção de etanol e conversão dos açúcares. Houve consumo de açúcar acima de 88% (Figura 7C) sendo que no 1° ciclo sobrou 5,1 g/L de açúcar residual, representando mais de 99% de

consumo contra 82% para o melhor resultado encontrado na amostra não suplementada. Estes resultados justificam não apenas os altos teores de etanol como também a maior produção de biomassa com a adição de sulfato de amônio.

Devido à média de 16% (v/v) de etanol no final do 2º ciclo (Figura 7B), inevitavelmente, ocorreu seleção das células mais resistentes à alta pressão alcoólica exercida no meio e, portanto as células que sobreviveram foram capazes de manter e elevar sua viabilidade para produção de biomassa e etanol nos demais ciclos. Como consequência desta seleção, no 3º ciclo há uma queda abrupta na viabilidade celular, um consumo de nitrogênio abaixo de 35 mg/L e produção média de etanol abaixo das amostras testemunhas.

No 4º ciclo, as amostras suplementadas voltaram a produzir valores acima de 15% etanol e finalizou o 6º ciclo com uma média de 16,1% (v/v) e uma biomassa de 15,3 g enquanto as amostras não suplementadas não ultrapassam os 13% (v/v) de etanol e 11 g de biomassa.

Em condições de 300 g/L a levedura CAT-1 obteve relação satisfatória entre biomassa e etanol, sendo a linhagem que mais se multiplicou e produziu valores acima dos 16% de etanol.

Figura 7 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 30° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem CAT-1, a 30°C e 60 rpm

4.3 Estudos com mosto concentrado a 35° Brix

Os resultados obtidos nesta concentração de açúcares são menos relevantes, visto que a viabilidade celular foi altamente afetada quando os açúcares do mosto foram concentrados a 35° (p/v). No 1° ciclo a viabilidade das leveduras sofreu queda elevada (Figura 8D), em torno de 25% devido a alta concentração de açúcar. Esta concentração provoca uma seleção natural das células de leveduras, e as mais resistentes permanecem atuando nos próximos ciclos, sofrendo apenas queda de 10% até o final do 6° ciclo, e atingindo viabilidade que variou de 61 a 65%. A viabilidade no tratamento suplementado é impactada também pela produção de etanol (Figura 8B) que apresentou valores significativamente maiores em quase todos os ciclos fermentativos.

O alto consumo de nitrogênio (Figura 8F) nos primeiros ciclos reflete a importância do suplemento para a eficiência fermentativa. Valores acima de 80 e 70 mg/L foram observados. No entanto do 4º ciclo em diante, o tratamento sem suplementação manteve uma viabilidade mais alta devido ao pouco estresse alcoólico, teve maior consumo de N livre, porém não ultrapassando os 60 mg/L. Como consequência da maior biomassa e de uma melhor eficiência fermentativa, restou menos açúcar residual no mosto. Em meio com 35° Brix, foi possível observar consumo acima de 200 g/L durante 24h de fermentação.

Os valores médios obtidos de massa úmida para as linhagens PE-2 no final do 6º ciclo foram de 11% para as amostras suplementadas contra 10,6% das amostras testemunhas. Valores semelhantes de biomassa foram encontrados por Pereira et al. (2010a) em mosto com 320 – 330 g/L de glicose.

Figura 8 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 35° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem PE-2, a 30°C e 60 rpm

Nesta concentração de sólidos solúveis, a levedura CAT-1 foi a que se mostrou mais adaptada. O consumo acima de 92 mg/L de Nitrogênio no 1º ciclo aliado a viabilidade em torno de 75% até o 4º ciclo fermentativo proporcionou a maior produção de etanol, atingindo o teor acima de 13% (v/v). As células adaptadas que permaneceram direcionaram a conversão do açúcar em etanol nos demais ciclos. Isto comprova o baixo valor de biomassa encontrada. O valor máximo de etanol foi de 15,2% (v/v) obtido no 3º ciclo no tratamento testemunha e 15,2% (v/v) no 6º ciclo com o tratamento suplementado (Figura 9B). O resultado foi semelhante aos valores encontrados por Breisha (2010) nesta concentração após 48h de fermentação.

Da mesma forma que a Linhagem PE-2, a levedura CAT-1 apresentou consumo de açúcar em torno de 200 g/L, porém apresentou menor sensibilidade ao estresse osmótico e maior eficiência fermentativa convertendo os açúcares principalmente em etanol. Entre os tratamentos, as amostras testemunhas apresentaram níveis maiores de açúcares residuais.

Ao contrário do caldo bruto, utilizado nas concentrações de 25° e 30°Brix, que inicialmente apresentaram 68 mg/L e 75 mg/L de Nitrogênio livre, respectivamente, a quantidade de nitrogênio livre no mosto acima de 110 mg/L foi suficiente para que nos tratamentos não houvesse diferenças significativas quanto aos parâmetros fermentativos. A adição de sulfato de amônio como nutriente na concentração de 35° Brix não influenciou a fermentação, sendo prejudicial nos últimos ciclos, devido à redução da viabilidade celular e ao estresse provocado pelo reciclo de células. Contudo, o fato do mosto apresentar quantidades apropriadas de nitrogênio reforça a idéia de que o elemento pode ser a causa para a manutenção da produção de etanol, acima de 14% após o 2º ciclo. Diversos autores têm mostrado a importância da suplementação nitrogenada para a manutenção do processo fermentativo e acúmulo de etanol (BATISTOTE et al., 2006; MIRANDA JUNIOR et al., 2008, 2009)

Figura 9 - Valores de biomassa (A), etanol (B), açúcar residual (C), viabilidade celular (D), desprendimento de CO₂ (E) e consumo de nitrogênio (F) durante fermentação de mosto concentrado a 35° Brix, sem (símbolos abertos) e com suplementação (símbolos fechados) com sulfato de amônio, pela linhagem CAT-1, a 30°C e 60 rpm

4.4 Desprendimento de CO₂

O desprendimento de CO₂ é outro fator importante que auxilia na compreensão do comportamento fermentativo das linhagens estudadas, já que este gás é o produto da fermentação e da respiração, sendo a primeira responsável pela liberação de duas moléculas de CO₂ e a última responsável pelo desprendimento de seis moléculas. O desprendimento de CO₂ na concentração de 25° Brix (Figura 10A) atingiu em torno de 3 g em 8 horas de fermentação durante o 1° ciclo e em torno de 6 g no 6° ciclo. Este comportamento se repete nos demais tratamentos (Figura 10B e 10C), ocorrendo uma ligeira diminuição do desprendimento conforme o aumento da concentração de açúcares.

Figura 10 - Desprendimento de CO_2 (g) referente ao 1° (■ ou ●) e 6° (□ ou ○) ciclos durante fermentação de mosto a 25° (A e C), 30° (B e E) e 35°Brix (C e F) pelas linhagens PE-2 (esq.) e CAT-1 (dir). Mosto sem suplementação (□) e mosto suplementado (○) com sulfato de amônio

Embora a viabilidade celular diminua a cada ciclo fermentativo, a fermentação se torna mais eficiente após o 1° ciclo, gerando cinética de desprendimento maior nos demais ciclos. Isto ocorre devido ao impacto inicial da pressão osmótica que provoca seleção natural das células mais resistentes já no 1° ciclo.

A cinética do desprendimento de CO_2 foi menor no 1° ciclo para as duas linhagens avaliadas e em todas as concentrações de açúcar, com exceção da levedura CAT-1 em mosto contendo 35°Brix, que no final do 1° ciclo apresentou desprendimento de 12,8 g semelhante ao 6° ciclo, confirmando a discrepância no valor de etanol encontrado em relação aos demais ensaios no ciclo inicial (Figura 10). Coincidentemente, o mosto utilizado nos ensaios a 35° Brix para a linhagem CAT-1 apresentaram valores maiores de N no mosto inicial, podendo ser a explicação desta exceção.

Entre as concentrações avaliadas, os ensaios realizados a 30°Brix apresentaram as maiores diferenças entre os tratamentos quanto ao desprendimento de CO₂ produzido, sendo estatisticamente significativo na maioria dos ciclos. A superioridade das amostras suplementadas pode ser observada nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 - Desprendimento de gás carbônico durante fermentação da linhagem PE-2 nos seis ciclos fermentativos (A-F) em mosto concentrado a 30°Brix. Tratamento testemunha (sem suplementação) (■) e tratamento suplementado (○) com sulfato de amônio

A fermentação da linhagem PE-2 em mosto a 30°Brix desprendeu acima de 13,5 g de CO₂ a partir do 2° ciclo, produzindo acima de 0,56 g por hora, enquanto o tratamento testemunha obteve apenas esta produção no 6° ciclo fermentativo.

Os valores obtidos pela linhagem CAT-1, foram ainda mais significativos, com exceção do 3° ciclo em que ocorreu uma queda elevada na viabilidade devido ao alto valor de etanol obtido no final do 2° ciclo. Para todos os outros ciclos, o desprendimento de CO₂ do

tratamento suplementado com sulfato de amônio é significativamente maior. O desprendimento foi em torno de 0,59g/h no 2°, 4° e 5° ciclos, atingindo o maior valor no 6° ciclo, equivalente a 0,66g por hora. As amostras não suplementadas tiveram o seu maior pico no 3° ciclo, atingindo 0,56g/h.

Figura 12 - Desprendimento de gás carbônico da linhagem CAT-1 nos seis ciclos fermentativos (A-F) durante fermentação da linhagem CAT-1 em mosto à 30°Brix. Tratamento testemunha (sem suplementação) (■) e tratamento suplementado (○) com sulfato de amônio

4.5 Açúcares residuais

Os açúcares do mosto no início da fermentação e após o 2°, 4° e 6° ciclos foram avaliados por cromatografia (Dionex). As quantidades iniciais de sacarose, glicose e frutose variaram devido ao processo de concentração, que foi realizado por meio de evaporação. Os valores médios de açúcares presente nos mostos iniciais foram em torno de 252 g/L, 306 g/L e 367 g/L nas concentrações de 25, 30 e 35° Brix, respectivamente. No geral, quase toda

sacarose foi hidrolisada restando no final dos ciclos apenas concentrações de glicose e frutose; a glicose foi o açúcar mais consumido. A linhagem PE-2 e CAT-1 em mosto suplementado apresentaram valores totais menores de açúcares redutores em todas as concentrações avaliadas. Na concentração de 25° Brix, a suplementação nitrogenada não influenciou as leveduras quanto ao aproveitamento dos açúcares. Valores abaixo de 2 g/L de açúcares redutores e pequenas concentrações de sacarose foram observadas, enquanto as amostras testemunha consumiram toda sacarose e apresentaram maiores quantidades de glicose e frutose. Em concentrações de 30° Brix, algumas diferenças foram destacadas. As amostras suplementadas apresentaram valores menores que 10 g/L de glicose e acima de 50 g/L de frutose para a linhagem PE-2 e menores que 1g/L glicose e 5 g/L de frutose para a linhagem CAT-1. Em contra partida, as amostras controle apresentaram concentrações de glicose acima de 14 g/L e 16 g/L, e frutose acima de 50 g/L e 36 g/L para as respectivas linhagens.

Figura 13 – Concentração de Sacarose (■), Glicose (■) e Frutose (■), no tempo inicial (T0) e após o 2°, 4° e 6° ciclos fermentativos das linhagens PE-2 (esq.) e CAT-1 (dir.) em mosto à 25° (A), 30° (B) e 35° Brix (C). Tratamento sem suplementação (C) e tratamento suplementado (S) com sulfato de amônio.

As concentrações dos açúcares totais, no final dos ciclos fermentativos estão apresentadas na Tabela 1. Esta concentração, representada em percentagem de açúcar residual, varia de acordo com a concentração inicial, tratamentos e a linhagem utilizada na fermentação. A linhagem PE-2 apresentou consumo acima de 96%, 64% e 53% nas concentrações de 25, 30 e 35° Brix, sendo que quando suplementada com sulfato de amônio a mesma linhagem apresentou valores acima de 99%, 75% e 60% nas concentrações analisadas respectivamente.

O consumo de açúcar também se tornou mais eficaz com o decorrer dos ciclos fermentativos, logo a sobra residual foi menor no último ciclo para ambos os tratamentos.

Tabela 1 - Percentagem de açúcar residual (%) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem PE-2 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C

Tratamento	Fermentação	25° Brix	30° Brix	35° Brix
Testemunha	2° Ciclo	$2,75 \pm 0,07$ aA	$35,07 \pm 0,19$ bA	$46,61 \pm 0,33$ cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		$0,23 \pm 0,04$ aB	$24,66 \pm 0,06$ bB	$39,20 \pm 2,83$ cB
Testemunha	4° Ciclo	$3,42 \pm 0,13$ aA	$25,55 \pm 0,10$ bA	$37,14 \pm 0,31$ cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		$0,26 \pm 0,01$ aB	$22,40 \pm 0,23$ bB	$32,95 \pm 0,95$ cB
Testemunha	6° Ciclo	$1,71 \pm 0,07$ aA	$20,88 \pm 0,18$ bA	$36,73 \pm 0,10$ cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		$0,17 \pm 0,02$ aB	$19,06 \pm 0,68$ bB	$33,98 \pm 0,37$ cB

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

As três concentrações analisadas diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância para ambos os tratamentos (linha). Quando comparado apenas os tratamentos em um determinado ciclo em uma determinada concentração, observa-se que todos os ensaios diferem estatisticamente (coluna), reafirmando que a suplementação com sulfato de amônio auxilia na redução de açúcares residuais totais no mosto, consequentemente, indica que houve maior desvio para produção de etanol e/ou biomassa (BETITE et al., 2012).

A linhagem CAT-1 (Tabela 2) apresentou valores inferiores de açúcares residuais nas maiores concentrações avaliadas. Para as amostras não suplementadas, o consumo foi acima de 94%, 76% e 69% nas concentrações de 25, 30 e 35° Brix, respectivamente, sendo que quando suplementada com sulfato de amônio a mesma linhagem apresentou valores acima de 93%, 88% e 70% nas concentrações analisadas, respectivamente. Observa-se que ao contrário da linhagem PE-2, a CAT-1 obteve consumo maior elevado nas concentrações mais altas e que a grande diferença entre os tratamentos ocorre na concentração intermediária de 30° Brix. Os resultados nesta concentração para as amostras suplementadas indicam a eficiência na conversão e utilização destes açúcares pela linhagem CAT-1 e sugere que o suplemento é responsável pela manutenção da viabilidade das células (INGLEDEW, 2005).

Tabela 2 - Percentagem de açúcar residual (%) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem CAT-1 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C

Tratamento	Fermentação	25° Brix	30° Brix	35° Brix
Testemunha	2° Ciclo	5,44 ± 0,15 aA	23,45 ± 0,53 bA	30,96 ± 1,14 cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		3,24 ± 0,21 aB	1,65 ± 0,20 bB	29,31 ± 1,51 cA
Testemunha	4° Ciclo	2,30 ± 0,15 aA	17,30 ± 0,18 bA	29,61 ± 0,45 cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		6,02 ± 0,25 aB	11,01 ± 0,65 bB	28,54 ± 0,86 cA
Testemunha	6° Ciclo	1,63 ± 0,14 aA	18,05 ± 0,44 bA	30,08 ± 0,59 cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		1,70 ± 0,06 aA	2,52 ± 0,08 bB	27,55 ± 1,39 cA

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Estatisticamente as concentrações diferem com aumento do Brix, no entanto, os tratamentos não diferem em todos os ensaios, não havendo qualquer significância a 35° Brix.

4.6 Concentrações de etanol no mosto fermentado

Os valores de etanol encontrados no final de cada ciclo fermentativo estão apresentados na Tabela 3 e 4. As linhagens apresentaram comportamentos diferentes quanto à produção de etanol nas diversas concentrações avaliadas. Para a linhagem PE-2 (Tabela 3) sem a suplementação nitrogenada, o aumento da concentração de sólidos solúveis no mosto provocou uma menor produção de etanol na maioria dos ciclos. Valores acima de 14% (v/v) na concentração de 25° Brix foram obtidos no 2° ciclo fermentativo, nas condições de 30° Brix, esta concentração de etanol, foi observada a partir do 4° ciclo e nas condições de 35° Brix o valor máximo atingido foi de 13,2% (v/v) no 5° ciclo fermentativo. Estes resultados revelam também que com o aumento da concentração de açúcar, a adaptação se torna mais lenta e a produção de etanol atinge valores maiores somente nos últimos ciclos fermentativos. Este comportamento é observado, principalmente, nas amostras sem suplementação.

Ao analisar as amostras suplementadas com sulfato de amônio, percebe-se que a recuperação das células são mais rápidas e a produção de etanol se equipara no 2° ciclo, não apresentando diferença entre a menor concentração de açúcar (25° Brix) e a intermediária (30° brix) (Tabela 3). Valores acima de 15,3% (v/v) de etanol foram alcançados nos dois últimos ciclos a 30° Brix e acima de 13,8% (v/v) do 4° ciclo em diante para a concentração de 35° Brix.

Tabela 3 - Valores médios de etanol %(v/v) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem PE-2 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C

Tratamento	Ciclo fermentativo	25° Brix	30° Brix	35° Brix
Testemunha	1°	9,88±0,17 aA	8,02±0,09 bA	6,22±0,17 cA
(NH ₄) ₂ SO ₄		11,07±0,16 aB	9,22±0,29 bB	6,73±0,37 cA
Testemunha	2°	13,79±0,14 aA	12,34±0,19 bA	10,70±0,03 cA
(NH ₄) ₂ SO ₄		14,12±0,02 aB	14,13±0,23 aB	12,17±0,12 bB
Testemunha	3°	<i>14,27±0,11 aA</i>	13,22±0,27 bA	11,73±0,3 cA
(NH ₄) ₂ SO ₄		14,06±0,13 aA	14,70±0,13 aB	13,21±0,28 bB
Testemunha	4°	<i>14,64±0,01 aA</i>	14,14±0,04 aA	12,64±0,13 bA
(NH ₄) ₂ SO ₄		14,25±0,13 aB	14,47±0,10 aB	13,87±0,20 bB
Testemunha	5°	<i>14,57±0,09 aA</i>	14,97±0,20 bA	13,25±0,15 cA
(NH ₄) ₂ SO ₄		14,14±0,02 aB	15,51±0,17 bB	13,81±0,26 cB
Testemunha	6°	<i>14,43±0,17 aA</i>	14,99±0,11 bA	12,95±0,1 cA
(NH ₄) ₂ SO ₄		14,31±0,14 aA	15,36±0,11 bB	13,84±0,25 cB

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Ao analisar estatisticamente os tratamentos a cada ciclo fermentativo, observa-se a importância da suplementação nitrogenada em concentrações maiores de açúcares. Os valores destacados em negrito na Tabela 3 apresentaram diferença estatística ao nível de 5% de significância, sendo que, os valores que estão em negrito, representam os resultados em que a adição de sulfato de amônio proporcionou maior produção de etanol e os valores em *itálico*, os resultados em que o tratamento testemunha atingiu as concentrações finais maiores de etanol no mosto.

Estes resultados novamente sugerem que a suplementação nitrogenada apresentam maiores impactos em concentrações elevadas (PEREIRA et al., 2010b). Considerando todos os ensaios fermentativos, as amostras suplementadas revelaram serem superiores em 72,2% deles, enquanto que apenas 11,1% dos ensaios foram positivos para as amostras sem suplementação e 16,7% não houve diferença estatística.

Conforme citado anteriormente, as duas linhagens estudadas apresentaram comportamentos diferentes. A linhagem CAT-1 parece ser mais “robusta” e tolerante ao estresse osmótico e também ao estresse alcoólico do que a linhagem PE-2. Os resultados de etanol encontrado nos seis ciclos fermentativos são superiores na maioria dos ensaios e não

necessariamente apresentaram queda na produção com o aumento da concentração de sólidos solúveis (Tabela 4). Diferentemente do observado para a levedura PE-2, a CAT-1 apresentou valores acima de 15% em todas as concentrações sendo que o menor valor a 35° Brix foi acima de 13% (v/v). Apesar desses diferentes comportamentos, vale destacar que ambas as leveduras, quando suplementadas com sulfato de amônio obtiveram os maiores valores de etanol e os melhores resultados apareceram nos ensaios a 30° Brix. Nesta concentração, para a linhagem CAT-1 a diferença entre os tratamentos chegou a ser de 4,5% (v/v) e manteve altos valores de etanol durante o reciclo de células.

Tabela 4 - Valores médios de etanol %(v/v) e análise de Tukey durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem CAT-1 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C

Tratamento	Ciclo fermentativo	25° Brix	30° Brix	35° Brix
Testemunha	1°	10,69±0,15 aA	7,82±0,14 bA	13,21±0,38 cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		12,62±0,14 aB	12,38±0,24 aB	13,14±0,04 bA
Testemunha	2°	14,26±0,41 aA	12,06±0,19 bA	14,82±0,26 aA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		14,54±0,26 aA	15,97±0,09 bB	14,71±0,01 aA
Testemunha	3°	15,20±0,25 aA	13,19±0,15 bA	15,21±0,15 aA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		12,93±0,17 aB	10,26±0,07 bB	14,83±0,18 cB
Testemunha	4°	15,14±0,20 aA	13,27±0,13 bA	14,95±0,41 aA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		13,63±0,13 aB	15,10±0,27 bB	14,69±0,14 bB
Testemunha	5°	15,07±0,23 aA	12,82±0,08 bA	14,77±0,15 aA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		14,86±0,16 aA	15,13±0,17 aB	15,20±0,11 aB
Testemunha	6°	15,15±0,12 aA	12,94±0,06 bA	13,87±0,18 cA
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		14,70±0,21 aB	16,08±0,16 bB	14,37±0,12 aB

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância

A análise estatística dos resultados encontrados seguem no mesmo destaque na Tabela acima, porém os valores em negritos, que são os ensaios em que houve significância para as amostras suplementadas, representam uma porção menor, compreendendo apenas 44,4% dos ensaios, contra 27,7% das amostras testemunhas (itálico) e 27,7% (sem marcação) onde não houve diferença significativa ao nível de 5%.

4.7 Rendimento e produtividade

O rendimento fermentativo foi calculado com base no consumo de açúcar (g/L) e produção de etanol (v/v); no cálculo de produtividade foi considerada a produção de etanol (g/L) e o tempo de 24h de fermentação para cada ciclo fermentativo.

Considerando que, o tempo de fermentação foi igual para ambos os tratamentos, a produtividade dos ensaios acompanhou os valores produzido de etanol e, portanto, as maiores taxas foram observadas na concentração de 30° Brix, atingindo valores acima do encontrado por Pereira et al. (2012). A produtividade máxima foi de 4,93 g/L/h para o tratamento testemunha e 5,05 g/L/h para o tratamento suplementado (Tabela 5).

A linhagem PE-2 apresentou um consumo de açúcar que variou de 197 g/L a 255 g/L. Os maiores consumo se deram na concentração de 25° Brix.

O tratamento com sulfato de amônio apresentou maior consumo de açúcar quando comparado ao tratamento sem a suplementação, atingindo em alguns ciclos a diferença de 20 g/L.

De modo geral, o rendimento foi alto e os melhores resultados variaram entre os tratamentos. Na concentração de 25°Brix o tratamento testemunha foi melhor, porém em concentrações elevadas de açúcar o rendimento dos mostos suplementados foi mais satisfatório, alcançando valores de até 96% de rendimento fermentativo.

Tabela 5 - Consumo de açúcar (g/L), produção de etanol % (v/v), produtividade (g/L/h) e rendimento fermentativo (%) durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem PE-2 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C

	Ciclo fermen- tativo	Tratamento	Açúcar consumido (g/L)	Etanol produzido % (v/v)	Etanol produzido % (P/V)	Produtivi- dade (g/L/h)	Rendimento fermentativo (%)
25° Brix	2°	Testemunha	250,3	13,79	10,87	4,53	85,08
	4°		248,6	14,64	11,55	4,81	90,95
	6°		253,0	14,43	11,40	4,75	88,09
	2°	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	255,1	14,12	11,14	4,64	85,49
	4°		254,9	14,25	11,26	4,69	86,31
	6°		255,2	14,31	11,29	4,70	86,60
30° Brix	2°	Testemunha	203,2	12,34	9,73	4,05	93,78
	4°		233,0	14,14	11,15	4,65	93,72
	6°		247,6	14,99	11,82	4,93	93,48
	2°	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	229,8	14,13	11,14	4,64	94,91
	4°		237,1	14,47	11,43	4,76	94,41
	6°		247,1	15,36	12,12	5,05	96,04
35° Brix	2°	Testemunha	197,4	10,7	8,44	3,52	83,72
	4°		232,4	12,64	9,96	4,15	84,00
	6°		233,9	12,95	10,22	4,26	85,49
	2°	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	224,3	12,17	9,60	4,00	83,81
	4°		247,3	13,87	10,95	4,56	86,62
	6°		243,5	13,84	10,91	4,55	87,78

A linhagem CAT-1, que mostrou ser mais robusta aos estresses provocados pelo meio, apresentou valores mais significativos, apresentando um consumo de açúcar que variou de 229 g/L à 304 g/L, atingindo teores mais elevados de etanol e, conseqüentemente, uma maior produtividade entre as linhagens. As maiores produtividades também foram observadas na concentração de 30° Brix, atingindo valores acima de 5,2 g/L/h de etanol em mais de um ciclo fermentativo. Para os melhores resultados do tratamento testemunha, a produtividade foi de 4,98 g/L/h de etanol na concentração de 25° Brix. Apesar dos parâmetros fermentativos terem sido mais satisfatório, o rendimento fermentativo foi menor que o encontrado na PE-2, uma vez que o consumo de açúcar foi relativamente maior e menos direcionado à produção de etanol. Contudo, houve um rendimento acima de 91% na concentração de 25° Brix.

Tabela 6 - Consumo de açúcar (g/L), produção de etanol % (v/v), produtividade (g/L/h) e rendimento fermentativo (%) durante fermentação de mosto a 25°, 30° e 35° Brix pela linhagem CAT-1 sem suplementação e com sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após o 2°, 4° e 6° ciclo, a 30°C

	Ciclo fermentativo	Tratamento	Açúcar consumido (g/L)	Etanol produzido % (v/v)	Etanol produzido % (P/V)	Produtividade de (g/L/h)	Rendimento fermentativo (%)
25° Brix	2°	Testemunha	237,5	14,26	11,26	4,69	92,73
	4°		245,4	15,14	11,94	4,98	95,28
	6°		247,1	15,15	11,95	4,98	94,69
	2°	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	236,6	14,54	11,48	4,78	94,90
	4°		229,8	13,63	10,76	4,48	91,60
	6°		240,4	14,70	11,59	4,83	94,45
30° Brix	2°	Testemunha	234,2	12,06	9,52	3,97	79,53
	4°		253,0	13,27	10,47	4,36	81,00
	6°		250,7	12,94	10,22	4,26	79,71
	2°	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	304,4	15,97	12,61	5,25	82,80
	4°		275,5	15,10	11,91	4,96	86,74
	6°		301,7	16,08	12,69	5,29	84,14
35° Brix	2°	Testemunha	253,0	14,82	11,70	4,87	90,48
	4°		258,0	14,95	11,80	4,92	89,51
	6°		256,2	13,87	10,95	4,56	83,60
	2°	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	259,1	14,71	11,60	4,83	87,69
	4°		261,9	14,69	11,58	4,83	86,63
	6°		265,5	14,37	11,35	4,73	83,59

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises dos resultados revelam que o comportamento das linhagens estudadas pouco difere entre si. A linhagem CAT-1 apresentou maior resistência á alta pressão osmótica do meio, produzindo maiores valores de etanol e consequentemente melhor produtividade fermentativa do que a linhagem PE-2. No entanto para os demais parâmetros, não houve comportamentos distintos entre as linhagens. De modo geral, a viabilidade celular sofre uma queda considerável no 1º ciclo, mantendo-se constantes nos demais ciclos, devido a sobrevivência de células mais resistentes ao estresse osmótico e consequentemente a produção de CO₂ é maior nos últimos ciclos fermentativos.

Dentre os tratamentos testados, a fermentação quando suplementada com sulfato de amônio foi satisfatória e significativa para ambas as linhagens somente na concentração de 30° Brix, em que foram observados um alto teor de etanol produzido, pequena sobra de açúcar residual e boa produtividade. A viabilidade não foi severamente afetada e houve moderada produção de biomassa de células e um rendimento acima de 90%.

Na concentração 25° Brix, o sulfato de amônio exerceu pouca influência no mosto, elevando a produção de etanol apenas em alguns ciclos fermentativos, enquanto que na concentração de 35° Brix, apenas a linhagem PE-2 suplementada com sulfato de amônio, apresentou valores maiores de etanol do que as amostras testemunhas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo indicou que a suplementação nitrogenada com sulfato de amônio pode favorecer alguns parâmetros fermentativos em mosto com alta concentração de açúcar, principalmente na concentração intermediária de sólidos solúveis, sendo possível alcançar teores entre 15 a 16% de etanol.

A suplementação nitrogenada com sulfato de amônio promoveu maior produção de biomassa em todas as concentrações estudadas para ambas as linhagens.

REFERÊNCIAS

- ABERNATHY, D.G.; SPEDDING, G.; STARCHER, B. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 115, n. 2, p. 89-164, 2009.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 20, p. 20–27, 1998.
- ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; DEQUIN, S.; BLONDIN, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 498, n. 1, p. 98-103, 2001.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros de fermentação alcoólica**. 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: FERMENTEC, 2005. 448 p.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, D.R.; AUSTIN, G.D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol text book**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 39-46.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol - Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multiciência**. Construindo a História dos Produtos Naturais, São Carlos, v. 7, p. 1-16, 2006.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years after Proalcool. **International Sugar Journal**, London, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2002.
- ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.C.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; NORONHA, M.F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; CUNHA, A.F.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; ALCARDE, A.R.; DIETRICH, F.S.; MCCUSKER, J.H.; PETES, T.D.; PEREIRA, G.A.G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 2271-2278, 2009.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta314.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2013.
- BAFRNCOVA, P.; SMOGROVICOVA, D.; SLAVIKOVA, I.; PATKOVA, J.; DOMENY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letter**, Dordrecht, v. 21, p. 337–341, 1999.

BAI, F.W.; ZHAO, X.Q. High gravity ethanol fermentation and yeast tolerance. **Microbiology Monographs**, Peoria, v. 22, p. 117-135, 2012.

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

BAI, F.W.; CHEN, L.J.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, p. 287-293, 2004.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R., McHALE, A.P. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1–43. (Biotecnologia Industrial, 3).

BASSO, L.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo comparativo entre a levedura "turbo" e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2003. p. 12-25.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ, 1996. p. 38-84.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. dos. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croatia: INTECH, 2011a. chap. 5, p. 85-100.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BATISTOTE, M.; CRUZ, S.H.; ERNANDES, J.R. Altered patterns of maltose and glucose fermentation by brewing and wine strains influenced by the complexity of the nitrogen source. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, p. 84–91, 2006.

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

BELCHER A. The world looks to higher-tech to advance fuel ethanol production into the 21st century. **International Sugar Journal**, London, v. 107, n. 1275, p. 196–199, 2005.

BETITE, V.C.; MIRANDA JUNIOR, M.; OLIVEIRA, J.E.; ERNANDES, J.R. Very high gravity sucrose fermentation by Brazilian industrial yeast strains: effect of nitrogen supplementation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 118, p. 174–178, 2012.

BISSON, L.F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 50, p. 107–119, 1999.

BLIECK, L.; TOYE, G.; DUMORTIER, F.; VERSTREPEN, K.J.; DELVAUX, F.R.; THEVELEIN, J.M. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 815–824, 2007.

BREISHA, G.Z. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass Bioenergy**, Oxford, v. 34, p. 1243–1249, 2010.

CALDAS, C. **Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras**. Maceió: Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool no Estado de Alagoas; Cooperativa Regional dos Produtores de Açúcar e de Alcool de Alagoas; Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (STAB - Regional Leste), 1998. 424 p.

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**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 639–646, 1984.

CRUZ, S.H.; CILLI, E.M.; ERNANDES, J.R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, p. 54–61, 2002.

DIEN, B.S.; BOTHAST, R.J. A primer for lignocellulose biochemical conversion to fuel ethanol. . In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, D.R.; AUSTIN, G.D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol text book**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 73–94.

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

DUFOUR, J.P.; GOFFEAU, A. Molecular and kinetic properties of the purified plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.105, n. 1, p. 145–154, 1980.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Resultados_Pre_BEN_2012.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2013.

FERES, P.F.D. **Os biocombustíveis na matriz energética alemã**: possibilidades de cooperação com o Brasil. Brasília: Fundação Alexandre de Gusmão, 2010. 300 p.

FERREIRA, L.V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. 2002. 266 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção do álcool: fermentação alcoólica**. Rio de Janeiro, 2008. 73 p.

FIGUEIREDO, C.M. **Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**. 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GIUDICI, P.; SOLIERI, L.; PULVIRENTI, A.M.; CASSANELLI, S. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 66, p. 622-628, 2005.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. Are biofuels a feasible option? **Energy Policy**, Surrey, v. 37, p. 10–14, 2009.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F.E.B.; COELHO, S.T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008. 150 p.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

HALLSWORTH, J.E. Ethanol-induced water stress in yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 85, n. 2, p. 125-137, 1998.

HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V.; LIMA, L.; MULDER, L.; GEURTS, W.; WALSH, M.; LONDESBOROUGH, J. Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 5, p. 1563-1573, 2010.

INGLEDEW, W.M. Improvements in alcohol technology through advancements in fermentation technology. **Getriede Technologie**, Berlin, v. 58, p. 308-311, 2005.

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

JONES, A.M.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 29, p. 483-488, 1994.

JONES, A.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Ethanolic fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 5, p. 1242-1246, 1994.

KALMOKOFF, M.L.; INGLEDEW, W.M. Evaluation of ethanol tolerance in selected *Saccharomyces* strain. **Journal of American Society of Brewing Chemistry**, Saint Paul, v. 43, p. 189-196, 1985.

LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 11, n. 2, p. 149-161, 1991.

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P. Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 4176-4182, 2009.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, p. 1384-1394, 1980.

LOPES, M.L. **Fermentec news**. 2012. Disponível em: <<http://fermentecnews.com.br/2012/10/22/fermentacao/>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

MA, M.; LIU, Z.L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 829-845, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice-Hall, 2008. 624 p.

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. **Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae***. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology, Department of Biology, 2004. 18 p.

MAGER, W.H.; SIDERIUS, M.N. Insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

MARTINI, S.; RICCI, M.; BONECHI, C.; TRABALZINI, L.; SANTUCCI, A.; ROSSI, C. In vivo ¹³C-NMR and modelling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letter**, Heidelberg, v. 564, n. 1/2, p. 63-68, Apr. 2004.

MIRANDA JUNIOR, M.; BATISTOTE, M.; ERNANDES, J.R. Glucose and fructose fermentation by wine yeasts in media containing complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 114, p. 199-204, 2008.

MIRANDA JUNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E.M.; ERNANDES, J.R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 115, p. 191-197, 2009.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, J.P.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, p. 817-830, 2010.

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

OLIVEIRA, A.A.C. **Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

ORTIZ-ZAMORA, O.; CORTÉS-GARCÍA, R.; RAMÍREZ-LEPE, M.; GÓMEZ RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M.G. Isolation and selection of ethanol-resistant and osmotolerant yeasts from regional agricultural sources in Mexico. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 32, n. 5, p. 775-786, 2009.

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

PANEK, A.D. Trehalose metabolism: new horizons in technological applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 169-181, 1995.

PEREIRA, A.F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. 2007. 99 p. Dissertação (M.S. em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

PEREIRA F.B.; GUIMARÃES P.M.R.; TEIXEIRA J.A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 7856–7863, 2010a.

_____. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 11, p. 1655-1661, 2010b.

_____. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011.

PEREIRA, F.B.; GOMES, D.G.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 34, p. 45-53, 2012.

PIDDOCKE, M.P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H.P.; NIELSEN, K.F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 453-464, 2009.

PIPER, P.W. The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 134, p. 121-127, 1995.

PULIGUNDLA, P.; REDDY, O.V.S. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: effect of nutrients. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 50, p. S82–S87, 2010.

- PULIGUNDLA, P.; SMORGROVICOVA, D.; OBULAM, V.S.R.; KO, S. Very high gravity(ACA) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1133-1144, 2011.
- ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. v. 1, 186 p.
- ROSA, M.F.; SÁ-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, n. 1, p. 23-27, 1992.
- SILVA, J.A.; SILVA, F.L.H.; ALVES, R.R.N.; SANTANA, D.P. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 695-698, 2006.
- SILVA-FILHO, E.A.; BRITO DOS SANTOS, S.K.; RESENDE ADO, M.; MORAIS, J.O.; MORAIS, M.A JR.; ARDAILLON D.S. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 88, p. 13-23, 2005.
- SOUZA, C.S.; THOMAZ, D.; CIDES, E.R.; OLIVEIRA, K.F.; TOGNOLLI, J.O.; AND LALUCE, C. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 1667-1677, 2007.
- SRICHUWONG, S.; FUJIWARA, M.; WANG, X.; SEYAMA, T.; SHIROMA, R.; ARAKANE, M.; MUKOJIMA, N.; TOKUYASU, K. Simultaneous saccharication and fermentation (SSF) of very high gravity (ACA) potato mash for the production of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 33, p. 890-898, 2009.
- SRIKANTA, S.; JALEEL, S.A.; GHILDYAL, N.P.; LONSANE, B.K. Technoeconomic feasibility of ethanol production from fresh cassava tubers in comparison to dry cassava chips. **Food/Nahrung**, Weinheim, v. 36, p. 253-258, 2006.
- STANLEY, D.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; ROGERS, P.; STANLEY, G.A. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, p. 139-149, 2010.
- STEWART, G.G.; RUSSELL, I. Brewer's Yeast, In *Brewing Sciences and Technology*, Series III, **The Institute of Brewing**, London, 1998.
- THEERARATTANANOON, K.; LIN Y.H.; PENG, D.Y. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high gravity conditions. **Process Biochemistry**, London, v. 43, p. 1253-1258, 2008.
- THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, 1994.

_____. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, London, v.31, n.4, p.321-331, 1996.

TORRES, B.B.; MARZZOCO, A. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1999. 360 p.

TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. **The Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 2, p. 177-183, 1956.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000. 931 p.

WEINGRILL, N. **Quais as diferenças entre o álcool de cana e o de milho?** Disponível em: <<http://super.abril.com.br/alimentacao/quais-diferencas-alcool-canamilho-446893.shtml>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p. 849–856, 2009.