

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

**Efeito protetor da sílica ativada na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae*
em fermentações com altos teores alcoólicos**

Matheus Ribeiro Barbosa Oliveira

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

Piracicaba
2020

Matheus Ribeiro Barbosa Oliveira
Bacharel em Biotecnologia

**Efeito protetor da sílica ativada na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* em
fermentações com altos teores alcoólicos**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

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

Piracicaba
2020

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

Oliveira, Matheus Ribeiro Barbosa

Efeito protetor da sílica ativada na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações com altos teores alcoólicos/ Matheus Ribeiro Barbosa Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

89 p.

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

1. Estresse osmótico 2. Ethanol Red® 3. Levedura 4. Reciclo celular 5. Y 904 I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir realizar esse sonho.

Aos meus pais, Marcelo e Luciana, por sempre me apoiarem, incentivando-me a buscar meus sonhos e nunca deixando de acreditar em mim.

À minha irmã Clara pela amizade.

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

Ao Engenheiro Agrônomo Dr. Horst Bremer Neto pelos ensinamentos, amizade e por incentivar a buscar meus sonhos.

Ao orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista, pelos ensinamentos, compreensão, paciência e conselhos que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao pessoal do laboratório, em especial, Ana Paula, Ricardo, Tamires, Gabriela, Eric, Rubens, Laysa, Bianca, Eduardo, Vitor Hugo, Maria Carolina, Helenilda, Layna, Rafael e Victor Alves, que me acolheram e ajudaram durante o curso de mestrado.

A todos os integrantes do grupo GTSBio pela ajuda e comprometimento.

À equipe técnica do laboratório, Pedrinho, Silvino e Rose, pela ajuda e ensinamentos.

À Usina Granelli pela concessão do material utilizado nesse estudo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida.

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

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram com a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Processo de produção do etanol	17
3.2 Fermentação alcoólica.....	18
3.3 Fermentação com alto teor alcoólico.....	19
3.4 Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....	20
3.4.1 Microrganismos contaminantes	21
3.4.2 Temperatura	22
3.4.3 pH.....	23
3.4.4 Pressão osmótica	23
3.4.5 Etanol	24
3.5 Metabólito indicativo de estresse - Glicerol.....	26
3.6 Efeito da sílica em microrganismos	27
3.7 Adaptação da levedura em condições de estresse	29
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Artigo 1- FERMENTAÇÕES COM ALTOS TEORES ALCOÓLICOS UTILIZANDO <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> Y904 EM MEIO SUPLEMENTADO COM SÍLICA ATIVADA.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
Substrato.....	42
Tratamentos	42
Condução dos ensaios de fermentação	43

Viabilidade celular	44
Biomassa celular	44
Determinação de açúcares totais e glicerol	44
Determinação do Teor Alcoólico	45
Rendimento fermentativo	45
Produtividade de fermentação.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
Viabilidade celular	46
Biomassa celular	48
Açúcares redutores totais residuais	51
Glicerol	52
Teor alcoólico	54
Rendimento fermentativo	56
Produtividade de fermentação.....	58
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	60
4.2 ARTIGO 2 - EFEITO PROTETOR DA SÍLICA ATIVADA NA ADAPTAÇÃO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ETHANOL RED® EM FERMENTAÇÕES COM ALTOS TEORES ALCOÓLICOS	65
RESUMO	65
ABSTRACT	65
INTRODUÇÃO.....	66
MATERIAL E MÉTODOS.....	67
Local de realização da pesquisa	67
Substrato	67
Tratamentos	68
Condução dos ensaios de fermentação	69
Viabilidade celular	70
Biomassa celular	71
Determinação de açúcares totais e glicerol.....	71
Determinação do Teor Alcoólico.....	71
Rendimento fermentativo	72

Produtividade de fermentação	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
Viabilidade celular	72
Biomassa celular.....	75
Açúcares redutores totais.....	76
Glicerol.....	77
Teor alcoólico.....	79
Rendimento fermentativo	81
Produtividade de fermentação	82
CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	84
5 CONCLUSÃO.....	89

RESUMO

Efeito protetor da sílica ativada na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações com altos teores alcoólicos

A fermentação com alto teor alcoólico foi introduzida na indústria cervejeira na década de 80. Posteriormente, na década de 90, foi proposta a “Very High Gravity fermentation (VHG)” na indústria alcooleira. A VHG é uma tecnologia de fermentação com base na tolerância da levedura às altas concentrações de etanol no meio. Esta tecnologia utiliza mostos com concentrações de açúcares redutores totais maiores do que 25 % (m v⁻¹), com a finalidade de obter vinhos com teores alcoólicos maiores do que 15% (v v⁻¹). A fermentação com alto teor alcoólico visa diminuir o volume de vinhaça, reduzir o consumo de energia, aumentar a produção de etanol por unidade de volume do biorreator. Por consequência, apresenta inúmeras vantagens técnicas, econômicas e ambientais. Na busca por alternativas para aperfeiçoar o processo de produção do etanol no país o presente trabalho visa contribuir com o avanço do setor sucroenergético, através de estudos sobre leveduras adaptadas e aptas para serem empregadas na fermentação com alto teor alcóolico. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da sílica ativada⁽⁺⁾ sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações com altos teores alcoólicos. Para tal, foram realizadas fermentações com alto teor alcoólico utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, das linhagens Y 904 e Ethanol Red[®] em meios suplementados com sílica⁽⁺⁾. No estudo foi possível concluir que a sílica⁽⁺⁾ minimizou os efeitos causados (redução de viabilidade e biomassa celular) pela alta concentração de etanol no meio sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y 904, porém a linhagem não se adaptou às condições de alto teor alcoólico com o decorrer dos 5 ciclos fermentativos. Já no ensaio com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®] a sílica⁽⁺⁾, nas concentrações de 100 e 300 mg L⁻¹, proporcionou efeito protetor sobre as células das leveduras, sendo possível a adaptação da levedura em fermentações com altos teores alcoólicos. Ao longo dos 5 ciclos fermentativos, as fermentações submetidas ao tratamento com sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ se destacaram dos demais tratamentos apresentando viabilidade celular entre 77,5 a 81,5%, produção de biomassa entre 8,1 a 10,0 g L⁻¹, rendimento de fermentação entre 90,0 a 95,3 % e produtividade fermentativa entre 7,3 a 10,9 mL L⁻¹ h⁻¹. Conclui-se que a sílica ativada⁽⁺⁾, pode contribuir com o aumento da tolerância de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações com altos teores alcoólicos. Contudo, a resposta aos efeitos positivos da sílica ativada dependem das linhagens de leveduras que são utilizadas.

Palavras-chaves: Estresse osmótico, Ethanol Red[®], Levedura, Reciclo celular, Y 904

ABSTRACT

Protective effect of activated silica on the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* in very high gravity fermentation

High alcohol fermentation was introduced in the beer industry in the 1980s. Later, in the 1990s, “Very High Gravity Fermentation (VHG)” was proposed in the alcohol industry. VHG is a fermentation technology based on the tolerance of yeast to high concentrations of ethanol. This technology uses wort with concentrations of total reducing sugars greater than 25% (m v⁻¹), in order to obtain wines with alcoholic contents above 15% (v v⁻¹). Very High Gravity Fermentation aims to decrease the volume of vinasse, reduce energy consumption, increase ethanol production per unit volume of the bioreactor. Consequently, it has numerous technical, economic and environmental advantages. In the search for alternatives to improve the ethanol production process in the country, the present work aims to contribute to the advancement of the sugar-energy sector, contributing to studies on adapted and suitable yeasts to be used Very High Gravity Fermentation. The purpose of this work was to carry out a study on the effect of activated silica⁽⁺⁾ on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations with high alcoholic levels. Thus, Very High Gravity Fermentation were carried out using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain Y 904 and Ethanol Red[®] in medium supplemented with silica⁽⁺⁾. In the study, it was possible to conclude that the silica⁽⁺⁾ minimized the effects caused (reduction of viability and cell biomass) by the high concentration of ethanol in the medium on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y 904, however the strain did not adapt to the conditions of high alcohol content over the course of the 5 fermentative cycles. In the study with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®], silica⁽⁺⁾ with the following concentrations 100 and 300 mg L⁻¹ provided a protective effect on yeast, allowing the adaptation of yeast in Very High Gravity Fermentation. Over the 5 fermentative cycles, the fermentations submitted to the treatment with silica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ stood out from the other treatments presenting cell viability between 77,5 to 81,5%, biomass production between 8.1 to 10.0 g L⁻¹, yield between 90.0 to 95.3% and fermentative productivity between 7.3 to 10.9 mL L⁻¹ h⁻¹. In conclusion, silica⁽⁺⁾ can contribute to the increased tolerance of yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in very high gravity fermentation. However, the response to the positive effects of silica⁽⁺⁾ depends on the yeast strains that are used.

Keywords: Osmotic stress, Ethanol Red[®], Yeast, Cell recycling, Y 904

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fluxograma da produção de etanol nas usinas de cana-de-açúcar..... 18
- Figura 2. Principais fatores que podem afetar a levedura durante a fermentação com alto teor alcoólico.
..... 21
- Figura 3. Principais efeitos causados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido alta concentração de etanol no meio. O etanol diminui o pH citosólico, sendo assim, a levedura aumenta a expressão dos genes Pma1 e Pma2, que codificam a enzima ATPase, no qual, é responsável por equilibrar o pH interno usando ATP. A depleção do nível de ATP inibe a atividade metabólica na célula. A alta concentração de etanol induz o acúmulo de ROS no citoplasma, causando danos ao DNA. O etanol também é responsável por desnaturar as principais enzimas da via glicolítica (piruvato quinase e hexoquinase) causando redução da atividade metabólica na levedura..... 25
- Figura 4. Viabilidade celular das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$)..... 46
- Figura 5. Biomassa celular das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$)..... 49
- Figura 6. Açúcares redutores totais residuais presente no vinho das fermentações submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).
..... 52
- Figura 7. Glicerol produzido pelas leveduras Y904 submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$)..... 53
- Figura 8. Teor alcoólico produzido pelas leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$)..... 55

Figura 9. Rendimento fermentativo das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 57

Figura 10. Produtividade de fermentação das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 58

Figura 11. Viabilidade celular das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 73

Figura 12. Biomassa celular das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 75

Figura 13. Açúcares redutores totais residuais presente no vinho das fermentações submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05).
..... 77

Figura 14. Glicerol produzido pelas leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 78

Figura 15. Teor alcoólico produzido pelas leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 80

Figura 16. Rendimento fermentativo das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância (p≤0,05)..... 81

Figura 17. Produtividade de fermentação das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$). 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos tratamentos realizados quanto a concentração de açúcar, concentração de uréia suplementada e tratamentos aplicados durante os 5 ciclos fermentativos no experimento. 43

Tabela 2. Descrição dos tratamentos realizados quanto a concentração de açúcar, concentração de uréia suplementada e tratamentos aplicados durante os 5 ciclos fermentativos no experimento. 69

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e segundo maior produtor de etanol no mundo. O que torna o país um dos principais produtores e exportadores de etanol é a presença de grandes áreas cultiváveis, assim como o clima favorável. De acordo com a União da indústria de cana de açúcar (UNICA, 2020), foram produzidos no Brasil na safra de 2019/20 642,67 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 35,95 bilhões de litros de etanol.

O processamento da cana-de-açúcar para obtenção de álcool gera vários subprodutos ou resíduos, como por exemplo: o bagaço, a torta de filtro e a vinhaça. O aproveitamento destes resíduos atua diretamente na redução do custo do produto final, representando um importante passo para aumentar a eficiência global da usina (CASTRO, 2013).

A vinhaça é um resíduo utilizado na fertirrigação nas lavouras de cana-de-açúcar das usinas, visto que, as suas características físico-químicas, à condiciona ser empregada como fertilizante. No entanto, a vinhaça pode apresentar alto poder poluidor, uma vez que, apresenta elevada carga de matéria orgânica e elevada concentração de sais e ácidos orgânicos (CORTEZ, 2014). Em geral, para cada litro de etanol produzido são gerados até 14 litros de vinhaça (ORTEGÓN et al., 2016). Sendo assim, é possível estimar que na safra 2019/20 foram produzidos aproximadamente 503 bilhões de litros de vinhaça no Brasil.

A fermentação com alto teor alcoólico é uma tecnologia que visa diminuir o volume de vinhaça, aumentar a produção de etanol e apresenta inúmeras vantagens técnicas, econômicas e ambientais. Os principais benefícios observados da fermentação com altos teores alcoólicos com reciclo celular na produção de etanol são: a redução do volume de vinhaça, economia com transporte da mesma até as áreas de fertirrigação, economia de energia (vapor) que pode ser empregada para cogeração de energia elétrica, economia de insumos (ácido sulfúrico e antibacterianos), economia de água circulando no processo e redução do número de centrífugas (THOMAS et al., 1996; AMORIN et al., 2010).

Na busca por alternativas para aperfeiçoar o processo de produção de etanol no país, esta pesquisa teve por objetivo contribuir com o avanço do setor sucroenergético, através de estudos sobre leveduras adaptadas e aptas para serem empregadas na fermentação com alto teor alcoólico.

REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; OLIVÉRIO, J. L.; BOSCARIOL, F. **Ecoferm**. Fermentação com até 16% de teor alcoólico: reduzindo a vinhaça pela metade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL E MOSTRA DE TECNOLOGIA E ENERGIA CANAVIEIRA - SIMTEC, 8., 2010.

CASTRO, H.F. Indústria alcooleira. **Processos Químicos industriais II**. v. 2. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

CORTEZ, L. A. B. et al. **Sugarcane bioethanol - R&D for Productivity and Sustainability**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 2014.

ORTEGÓN, G. P.; ARBOLEDA, F. M.; CANDELA, L.; TAMOH, K.; VALDES-ABELLAN, J. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 410–419, 2016.

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

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra2019/2020**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em 04 de junho de 2019.

2 OBJETIVOS

Investigar a adaptação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens Y904 e Ethanol Red[®], para realizar fermentações com altos teores alcoólicos;

Verificar o efeito protetor da sílica ativada na adaptação de leveduras às fermentações com altos teores alcoólicos;

Investigar o rendimento e a produtividade de fermentações alcoólicas, conduzidas com o uso das leveduras Y904 e Ethanol Red[®] adaptadas às fermentações com alto teor de açúcar no mosto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Processo de produção do etanol

Nos últimos anos têm ocorrido alterações climáticas ao redor do mundo, sendo que, o principal motivo dessas mudanças climáticas está ligado a emissão de gases de efeito estufa na atmosfera através da queima de combustíveis fósseis (ROCHA; BUCKERIDGE, 2009). Uma alternativa para minimizar os efeitos ambientais desses poluentes e ao mesmo tempo aumentar a produção de energia no país é a utilização dos biocombustíveis (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). O etanol é um dos principais biocombustíveis que se destaca no cenário econômico mundial. Este biocombustível se caracteriza por ser um produto renovável e economicamente viável, sendo produzido através da fermentação de materiais orgânicos (principalmente cana-de-açúcar e milho (CARDONA; SANCHEZ, 2007; ARGUESO et al., 2009). O etanol é empregado no Brasil como combustível automotivo de duas maneiras: como etanol hidratado em veículos a álcool ou Flex-Fuel (hidratado), ou como etanol anidro onde é misturado com a gasolina (CARDOSO, 2006).

O processo de produção do etanol é iniciado com a recepção e moagem da cana-de-açúcar, onde o caldo é separado do bagaço (fibras). No país, a extração do caldo é realizada a partir da extração do caldo sobre pressão de rolos, montados em conjuntos com quatro a sete sucessivos ternos de moenda. O caldo é tratado quimicamente (caleagem), aquecido e decantado, onde as impurezas são retiradas. Em seguida o caldo é evaporado para que a concentração de açúcar seja ajustada e este é misturado com o melaço o que origina o mosto que será fermentado. Na dorna de fermentação, o mosto é adicionado junto com as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), para dar início à fermentação, a qual dura em média entre 8-12 horas, onde o produto final é o vinho a uma concentração entre 7% a 10% de álcool (BNDES/CGEE, 2008).

No Brasil, o processo de fermentação mais utilizado é o *Melle-Boinot*, no qual as leveduras são recuperadas mediante a centrifugação e tratadas para serem reutilizadas no processo fermentativo. Enquanto, o vinho é enviado para destilaria, onde o etanol é recuperado na forma hidratada com 96^o GL. O etanol hidratado é enviado para a coluna de desidratação, onde o ciclohexano é adicionado e o produto final é o etanol anidro 99,7^o GL (BNDES/CGEE, 2008). A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar pode ser ilustrada na Figura 1.

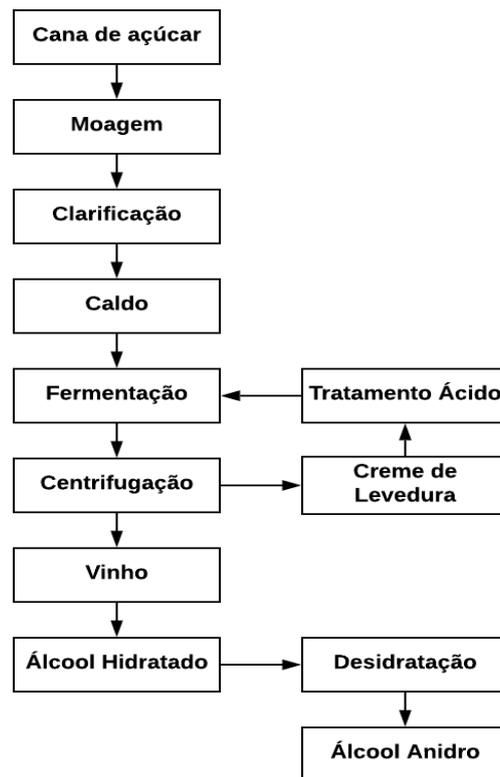


Figura 1. Fluxograma da produção de etanol nas usinas de cana-de-açúcar.

3.2 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica ocorre no interior de microrganismos capazes de converterem açúcares em etanol, através de uma série de reações bioquímicas. A levedura mais comumente utilizada na fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae* (ZHAO; BAI, 2009). Entre os açúcares fermentescíveis pelas leveduras estão os monossacarídeos glicose, frutose, manose e galactose, bem como os dissacarídeos maltose e sacarose e os trissacarídeos rafinose e maltotriose (RUSSELL, 2003). A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula (BAI et al., 2008). As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, são capazes de crescerem na presença ou na ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio e baixa concentração de açúcar, pouco ou nenhum etanol é produzido e a levedura segue a fosforilação oxidativa (respiração aeróbia), utilizando o oxigênio comoceptor final de elétrons. Entretanto, na ausência de oxigênio (anaerobiose) ou alta concentração de glicose, o etanol é o principal produto final. A levedura

Saccharomyces cerevisiae pode, portanto, alternar da respiração para fermentação alcoólica. Em condições anaeróbias o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂. Teoricamente, pode ser obtido até 51,1 g de etanol e 48,9 g de CO₂, em relação à 1 Mol de glicose metabolizado e ainda são produzidos na glicólise dois moles de ATP (adenosina trifosfato), usados para a manutenção energética das células. Segundo alguns pesquisadores (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001) as condições ótimas de trabalho para a *Saccharomyces cerevisiae* são: temperatura na faixa de 26-35⁰C, com média de 30⁰C; pH entre 4 e 5. Além disso, são altamente toleráveis ao produto formado.

Ao final da fermentação são formados alguns subprodutos, tais como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores. Esses são produzidos em pequena quantidade em relação à quantidade de etanol. A produção desses subprodutos, bem como o crescimento e manutenção celular, direciona intermediários da via glicolítica para as vias metabólicas correspondentes, diminuindo a produção de etanol. (INGLEDEW, 1999). O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica, com o papel de manter o balanço redox no citosol da célula, especialmente em condições anaeróbias, compensando reações celulares que produzem NADH (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

3.3 Fermentação com alto teor alcoólico

A fermentação com alto teor alcoólico foi introduzida na indústria cervejeira na década de 80 (THOMAS et al., 1996). Posteriormente, na década de 90, foi proposta a “Very High Gravity fermentation (VHG)” na indústria alcooleira. A VHG é uma tecnologia de fermentação com base na tolerância da levedura às altas concentrações de etanol. Esta tecnologia utiliza mostos com concentrações de açúcares redutores totais maiores do que 25 % (m m⁻¹), com a finalidade de obter vinhos com teores alcoólicos maiores que 15% (v v⁻¹) (NUANPENG et al., 2011; SRIDEE et al., 2011).

A integridade das células das leveduras é afetada quando submetida à alta tensão de osmolaridade no início da fermentação, cujos níveis de açúcar estão elevados no meio. As leveduras também sofrem com os efeitos proporcionados pelos altos teores de etanol no final da fermentação. Estes estresses osmóticos ocorridos durante a fermentação com alto teor alcoólico reduzem o crescimento e aumenta a perda de viabilidade celular. O êxito da fermentação VHG, depende da capacidade da levedura em se adaptar às condições de alta concentração de açúcar e alta concentração de etanol, sendo assim, é necessário compreender

os mecanismos de adaptação da levedura às condições desfavoráveis (PULIGUNDLA et al., 2011; THOMAS, 1994). Diversos estudos têm sido realizados a fim de minimizar os estresses ao qual as leveduras são submetidas evitando assim fermentações incompletas e lentas. Desta forma, os agentes osmoprotetores como: ergosterol, ácido oleico, óleos vegetais, leite em pó desnatado, quitina, polissacarídeos e suplementação de micélio fúngico foram estudados e têm demonstrado promover benefícios à levedura (REDDY; REDDY, 2005).

A fermentação com alto teor alcoólico desperta grande interesse econômico e ambiental. O grande atrativo por esta tecnologia consiste na redução dos custos na produção de etanol, sendo possível destacar: redução com os custos de mão de obra e energia por litro de etanol produzido, o menor consumo de água na destilação, redução na sobrevivência e proliferação de contaminantes, etc (THOMAS et al., 1996). De acordo com PULIGUNDLA et al. (2011), 30% dos custos do processo de produção do etanol se encontra na destilação. Apesar de todas as vantagens destacadas, o processo fermentativo com alto teor alcoólico apresenta alguns desafios a serem superados. Estes são: as leveduras disponíveis no mercado apresentam limitada tolerância às altas concentrações de etanol, os severos estresses impostos na VHG, devido a forte inibição do etanol durante o estágio de produção (BASSO et al., 2003, BAI et al, 2004).

3.4 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Durante a fermentação alguns fatores podem afetar a fermentação alcoólica como: microrganismos contaminantes, temperatura, pH, pressão osmótica e etanol (BAI et al., 2008). Os efeitos que afetam a fermentação alcoólica podem ser observados na Figura 2.

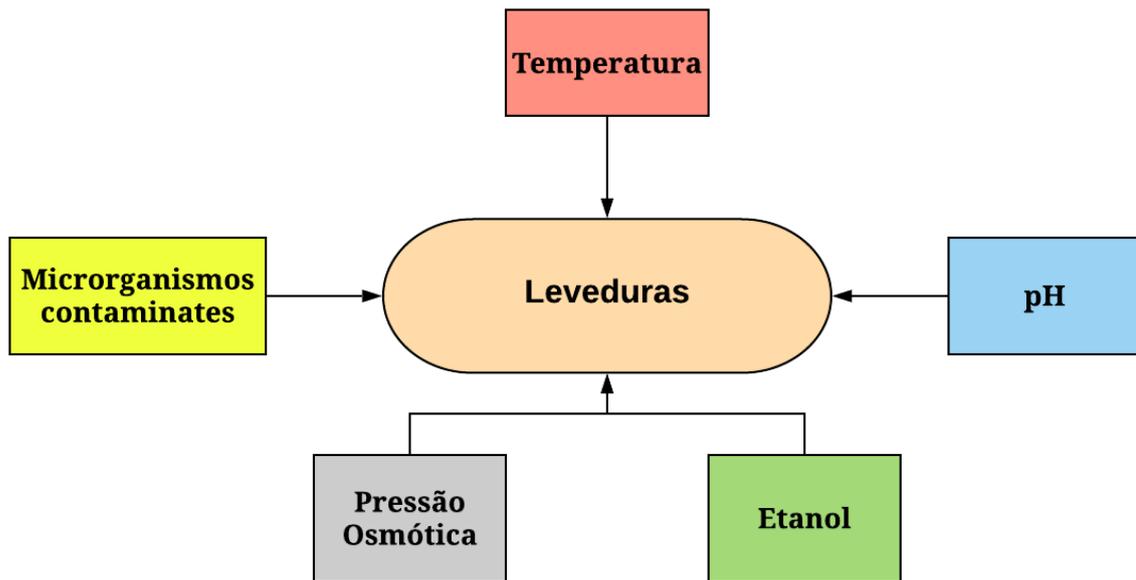


Figura 2. Principais fatores que podem afetar a levedura durante a fermentação com alto teor alcoólico.

3.4.1 Microrganismos contaminantes

A presença de microrganismos de diversas espécies de bactérias e fungos é algo já evidenciado desde o crescimento da cana-de-açúcar no campo até a chegada na indústria. (ALTHEERTUM et al., 1984).

A contaminação por microrganismos é algo inegável na indústria, sendo que as contaminações encontradas no caldo fermentativo são oriundas da falta de cuidados assépticos nas diversas etapas deste processo. É possível destacar algumas etapas como: a colheita, o transporte, a entrega e o processamento da cana-de-açúcar (SOLOMON, 2009). Dentre os gêneros de bactérias mais comumente encontradas são: *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium*. Já os fungos mais comuns encontrados são: *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (GALLO, 1989).

A presença de microrganismos contaminantes no processo fermentativo proporciona uma série de problemas para a indústria como: o consumo do substrato (açúcares, compostos nitrogenados); liberação de diversos metabólitos tóxicos para a levedura e a indução da

floculação das leveduras; redução da eficiência fermentativa e menor produção de etanol. (BASSO et al., 2011).

Para minimizar os efeitos dos microrganismos contaminantes encontrados no processo fermentativo algumas medidas podem ser adotadas: maior controle asséptico dos processos de colheita, transporte e moagem da cana-de-açúcar; maior rigor no controle da água utilizada no processo; controle de fatores como temperatura, pH no mosto, utilização de antibióticos e antissépticos e utilização de linhagens mais competitivas que as leveduras selvagens. (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 1998; LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

3.4.2 Temperatura

A temperatura é um fator importante a ser controlado durante a fermentação alcoólica, uma vez que, essa pode afetar o crescimento celular e as atividades metabólicas da levedura. Assim como todos os microrganismos, a levedura possui temperatura mínima, ótima e máxima de crescimento. Sendo assim, para que haja a conversão do açúcar em etanol é necessário que a fermentação seja conduzida na faixa de temperatura ideal de trabalho da levedura (WALKER, 1998). De acordo com LIMA; BASSO; AMORIM, (2001) as condições de temperaturas ótimas de trabalho para a *Saccharomyces cerevisiae* são na faixa de 26-35⁰C

Na fermentação alcoólica é de interesse da usina que as leveduras possam trabalhar em temperaturas mais elevadas (acima de 35⁰C) com sucesso, a fim de diminuir o custo de produção. As vantagens de realizar o processo fermentativo em alta temperatura são: redução nos custos de resfriamento e a fácil recuperação do etanol (SREE et al.,2000). No entanto, as fermentações alcoólicas conduzidas em temperaturas acima de 35⁰C favorecem o crescimento celular das bactérias contaminantes e também proporcionam redução na viabilidade celular da levedura (TORIJA et al., 2003). As alterações observadas na levedura devido ao efeito das altas temperaturas são desnaturação de proteínas, aumento do influxo de prótons, aumento do teor de proteínas de choque-térmico (HSPS), acúmulo de trealose e dos níveis de ergosterol nas membranas (ATTFIELD, 1987; ALDIGUIER et al., 2004; DOĞAN et al., 2014).

Estudos mostraram que a condução da fermentação em elevadas concentrações de etanol e altas temperaturas proporciona um sinergismo entre esses dois fatores que potencializa o efeito estressante sobre a levedura (ALDIGUIER et al., 2004; DOĞAN et al., 2014). Desta maneira, em fermentação com alto teor alcoólico é necessário diminuir a temperatura (30⁰C)

para evitar a queda da viabilidade celular e manter os níveis de produção elevados (LALUCE et al. 2009; BARBOSA, 2013).

3.4.3 pH

A concentração de H^+ presente no meio fermentativo influencia principalmente a permeabilidade da membrana plasmática para alguns nutrientes essenciais às leveduras, sendo assim, é necessário controlar o valor do pH do mosto (ZABED et al., 2014). De acordo com LIMA; BASSO; AMORIM, (2001), a faixa de pH dos mostos industriais se encontram entre 4,5 a 5,5. Na indústria, é comum realizar o tratamento ácido durante o reciclo celular, com o objetivo de eliminar microrganismos contaminantes. No entanto, o tratamento ácido provoca lixiviação de nutrientes tais como, N, P e K da levedura e proporciona a acidificação citoplasmática celular (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Para minimizar o efeito da alta concentração de H^+ intracelular, a levedura precisa gastar mais energia (ATP) para bombear o H^+ para o meio extracelular (BAI et al., 2008).

Outro fator que potencializa a acidificação intracelular na levedura, é a presença de ácidos orgânicos fracos no meio (acético, láctico, pirúvico e succínico). Quando o pH do meio fermentativo é baixo, os ácidos orgânicos adquirem uma forma protonada que permitem estes atravessarem a membrana plasmática com maior facilidade. Dentro do citoplasma da levedura os ácidos orgânicos se dissociam liberando prótons e ânions acidificando a célula. A levedura pode liberar os ácidos orgânicos para o exterior celular a custo de ATP, no entanto, os ânions podem reassociar com os prótons no meio extracelular e difundir na membrana plasmática novamente. Isso proporciona um gasto dispendioso de energia para manter a homeostase celular (ORIJ et al., 2011).

3.4.4 Pressão osmótica

O fenômeno de osmose é a passagem espontânea de um solvente de um meio menos concentrado para outro mais concentrado, através de uma membrana semipermeável, até atingir o equilíbrio. A pressão osmótica é a pressão que deve ser aplicada no sistema para evitar o fluxo do solvente puro. (JOHN et al., 2012).

O efeito do estresse osmótico ocorre na membrana plasmática e atua diretamente sobre o equilíbrio homeostático da levedura. Em ambiente com alta osmolaridade, a levedura tende a perder água para o meio, levando a um processo de desidratação celular (MAGER; SIDERIUS, 2002). Para minimizar esse efeito, a levedura bloqueia o crescimento celular e aumenta a produção de glicerol no citoplasma. Os principais efeitos do aumento da pressão osmótica sobre a levedura é a diminuição da sua viabilidade celular e redução de tamanho da célula (PARMAR et al., 2011).

O estresse osmótico pode ainda ser potencializado por altas temperaturas e etanol, atuando de forma sinérgica sobre a membrana plasmática da levedura. A alta pressão osmótica do meio pode também aumentar a toxicidade do ácido lático, que inibe o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* (GRAVES et al., 2006).

Uma maneira para ampliar a captação de nutrientes essenciais e fortalecer a resposta ao estresse osmótico de acordo com diversos estudos é a suplementação do meio com diversos materiais particulados, tais como: ergosterol, óleos insaturados e fontes nitrogenadas (THOMAS et al., 1994; PARMAR et al., 2011).

3.4.5 Etanol

O etanol é um agente que pode causar efeitos tóxicos sobre as células das leveduras quando presente em altas concentrações (ANSANAY-GALEOTE et al., 2001). Quando a levedura é exposta a este estresse o seu estado fisiológico é alterado (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998). Os efeitos que a alta concentração de etanol causam na levedura podem ser observados na Figura 3.

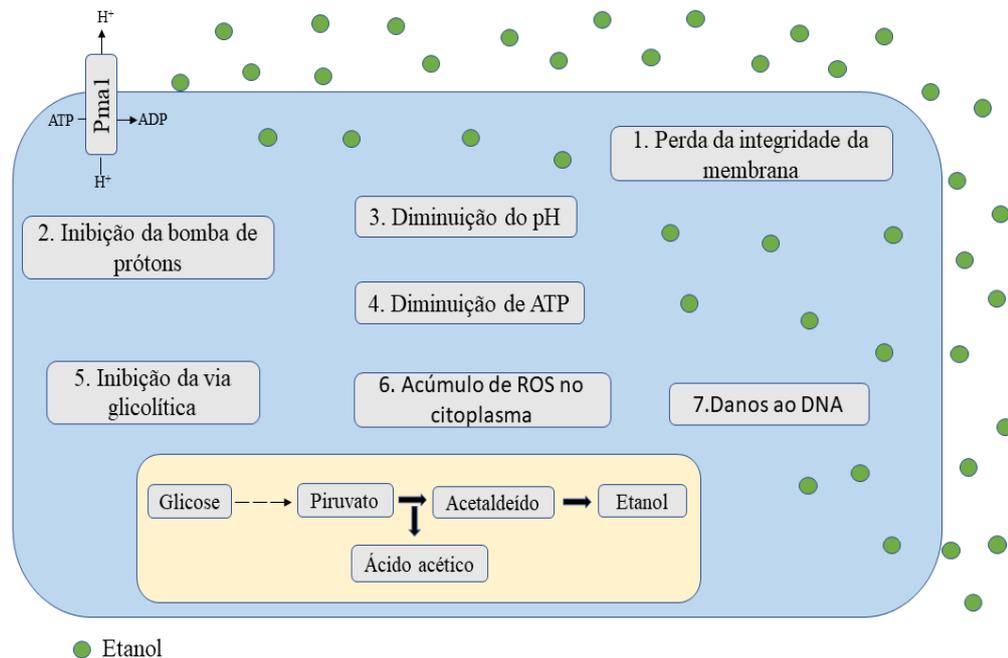


Figura 3. Principais efeitos causados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido alta concentração de etanol no meio. O etanol diminui o pH citosólico, sendo assim, a levedura aumenta a expressão dos genes Pma1 e Pma2, que codificam a enzima ATPase, no qual, é responsável por equilibrar o pH interno usando ATP. A depleção do nível de ATP inibe a atividade metabólica na célula. A alta concentração de etanol induz o acúmulo de ROS no citoplasma, causando danos ao DNA. O etanol também é responsável por desnaturar as principais enzimas da via glicolítica (piruvato quinase e hexoquinase) causando redução da atividade metabólica na levedura.

Fonte: DOĞAN et al., 2014(Adaptado).

Inicialmente, o etanol forma pontes de hidrogênio com os grupos polares dos fosfolípidios presentes na membrana, afetando a tensão superficial na interface lipídica-água, induzindo a desidratação da célula (ARATONO et al., 1997). Essas alterações nos fosfolípidios e nos ácidos graxos insaturados interfere na integridade da membrana e promove o aumento na permeabilidade e fluidez de alguns íons (principalmente H^+). Como consequência, ocorre a dissipação do gradiente eletroquímico através da membrana diminuindo o pH intracelular (BAYROCK; INGLEDEW, 2001). Ocorrendo a acidificação no interior da célula, a levedura busca minimizar esse efeito aumentando os níveis de expressão dos genes PMA1 e PMA2 que codificam a ATPase. Essa enzima auxilia no transporte de prótons através da membrana vacuolar consumindo ATP, de modo a neutralizar o meio intracelular (STEVENS;

FORGAC,1998; INOUE et al., 2005). Devido ao gasto ATP para manter a homeostase da membrana plasmática a atividade metabólica na célula será reduzida (DOĞAN et al., 2014).

Quando presente em altas concentrações na célula, o etanol causa alterações conformacionais nas proteínas, promovendo a desnaturação e disfunção das principais enzimas da via glicolítica (piruvato quinase e hexoquinase), causando redução da atividade metabólica na levedura (MILLAR et al., 1982; MA; LIU, 2010).

Outro efeito do etanol na levedura observado por DU; TAKAGI (2007) foi o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular durante a exposição ao estresse do etanol. As células deficientes de enzimas antioxidantes são incapazes de manter a baixa concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) causando danos ao DNA, lipídios e proteínas (AUESUKAREE et al., 2009).

3.5 Metabólito indicativo de estresse - Glicerol

O glicerol é um metabólito produzido por muitos microrganismos (bactérias, leveduras, fungos e algas), sendo esse responsável por balancear a pressão osmótica das células no ambiente (TAHERZADEH et al., 2002). Na fermentação alcoólica a *Saccharomyces cerevisiae* converte o açúcar em etanol e CO₂, no entanto, alguns subprodutos são formados, sendo o glicerol o principal deles (ARRUDA, 2007). O acúmulo de glicerol é uma resposta ao estresse osmótico sobre a levedura. Em condições anaeróbicas, o metabolismo da levedura sintetiza o glicerol para manter o balanço redox no interior das células. Esse fato ocorre, pois, as condições estressantes do meio proporcionam um excesso de NADH na célula, sendo assim o NADH é reoxidado a NAD⁺ através da formação do glicerol (BASSO et al., 1996; WANG et al., 2001). A regeneração do NAD⁺ através da formação do glicerol acontece, uma vez que, a quantidade de NAD⁺ regenerado na produção de etanol não é suficiente para atender as necessidades da levedura (WANG et al., 2001).

Os principais fatores que influenciam o aumento da produção de glicerol pela célula são: a linhagem de levedura; a concentração de inóculo; pH; concentração de sulfito; fonte de nitrogênio; aeração; concentração de açúcar e concentração de etanol (GUTIERREZ, 1991).

O glicerol é um composto que pode ser acumulado na levedura, pois não apresenta efeito tóxico ou inibitório nas células do microrganismo. No entanto, o aumento da formação de

glicerol está ligado a diminuição da produção de etanol, uma vez que, o glicerol é produzido na mesma via bioquímica que o etanol, proporcionando uma redução na eficiência fermentativa (BASSO et al., 1996).

Diversos autores mostraram que o glicerol atua na levedura, de forma, a conferir um efeito de proteção celular (ERASMUS et al., 2003; LI et al., 2009). Situações de alto estresse osmótico leva a desidratação celular e colapso da membrana plasmática, sendo assim a levedura aumenta a produção de glicerol para aumentar a sobrevivência e proliferação celular (PULIGUNDLA et., 2011).

3.6 Efeito da sílica em microrganismos

Sílica refere-se aos compostos de dióxido de silício (SiO_2) que podem ser encontrados nas formas de sílicas cristalinas, sílicas vítreas e sílicas amorfas. A sílica amorfa pode ser encontrada na natureza como sílica biogênica e sílica não biogênica (HEANEY; BANFIELD, 1993)

A sílica não biogênica é formada como vidro vulcânico a partir do magma. Enquanto, a sílica de origem biológica é produzida por diatomáceas, radiolários e esponjas que assimilam a sílica dissolvida em água para formar suas estruturas. No fundo do mar os esqueletos de diatomáceas solidificam e formam depósitos de terra diatomácea que são encontrados em argilas e bentonita (ROSS et al., 1993; RABOVSKY, 1995).

A sílica biogênica também é sintetizada por uma variedade de plantas, como por exemplo: cana-de-açúcar, capim-canário, trigo e arroz. Sendo que, esta pode ser encontrada na forma de fibras ou espículas. No entanto, o teor de sílica é maior em gramíneas podendo corresponder a 20% do peso seco. Nos vegetais a silificação interna ocorre para proporcionar integridade estrutural e proteção contra patógenos e insetos. (HEANEY; BANFIELD, 1993). A sílica biogênica vegetal é incorporada ao solo através da queima ou deterioração da planta, podendo apresentar no solo concentrações de 1 a 3%. (NEWMAN, 1986)

Na indústria a sílica amorfa é empregada como agente antiaglomerante e como um excipiente em fármacos para várias preparações de drogas e vitaminas. Essa pode ser utilizada também para retenção de voláteis, microencapsulação, agente de dispersão, clarificação de

bebidas, controle de viscosidade, agente antiespumante e modificador de massa (VILLOTA; HAWKE, 1986).

A sílica ⁽⁺⁾ é encontrada no mercado como um pó mineral de dióxido de silício micronizado. Esta é um mineral 100% natural, altamente puro, ao qual é utilizado para ajudar a potencializar as trocas iônicas entre a água e substâncias (CERESCO NUTRITION, 2020). DECAUX (2017) reporta que a adição de sílica ⁽⁺⁾ na ração de porcos aumenta o potencial iônico de água no sistema digestivo, aumentando a absorção de cálcio e fósforo. Enquanto TRAN, et al (2015) verificaram que a adição de sílica⁺ na alimentação de aves aumenta absorção de NH₄ e reduz a volatilização de NH₃.

Alguns autores relataram o possível meio de atuação de compostos derivados do silício sobre microrganismos. UMAMAHESWARI et al. (2016) reportaram que o silício pode atuar, quando adsorvido no microrganismo, formando um composto que age como uma espécie de membrana semipermeável muito semelhante às membranas formadas por compostos orgânicos, permitindo a passagem de algumas substâncias e impedindo a passagem de outras substâncias. Por outro lado, WEINZIERL et al. (2009) mostraram que o composto tetraetilortossilicato pode se ligar, quando em contato, com a superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa interação eletrostática de carga e grupos polarizados de polissacarídeos, proteínas e lipídios presentes na superfície celular e as moléculas de ácido silícico em solução podem explicar o crescimento celular em condições adversas. Estudos mostraram que ácido silícico e outros compostos contendo silício promovem o crescimento de *Pseudomonas stutzeri* sob condições oligotróficas, uma vez que, compostos de silício podem auxiliar na absorção de amônia e CO₂ da atmosfera, permitindo assim que as bactérias fixem o CO₂, utilizando energia obtida a partir da oxidação do amônio (UMAMAHESWARI et al., 2016).

No entanto, outros autores mostraram que adicionando materiais particulados na fermentação, estes contribuíram com o desempenho fermentativo da levedura. THOMAS et al. (1994) reportaram que materiais particulados como alumínio e terra diatomácea podem servir como locais de nucleação para a formação de bolhas de CO₂, que podem minimizar os efeitos inibitórios no crescimento da levedura. Uma vez que, a supersaturação do meio com CO₂ tem demonstrado afetar a captação de certos aminoácidos e carboidratos por parte das leveduras. Em estudos realizados para melhorar a qualidade do vinhos GROAT; OUGH (1978) mostraram que a adição de terra diatomácea e agitação em mostos clarificados provocam um aumento na taxa de fermentação. Como consequência, foi possível obter um vinho inicial de melhor

qualidade após a fermentação.

3.7 Adaptação da levedura em condições de estresse

Na indústria sucroalcooleira as leveduras são empregadas em condições altamente estressantes nos processos fermentativos. Tendo em vista essas condições adversas, as usinas necessitam cada vez mais de linhagens de leveduras robustas para realizar o processo fermentativo com alta eficiência (SILVA-FILHO et al., 2005).

As leveduras necessitam apresentar resistência a múltiplos fatores estressantes como: altas temperaturas; baixo pH, alta concentração de açúcar; alta concentração de etanol e o reciclo celular (MUSSATO et al., 2010). As células podem ser expostas às combinações simultânea ou sequenciais dos diferentes tipos de estresses durante o ciclo fermentativo. É importante destacar que o metabolismo entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são bem distintas, desta maneira cada linhagem apresenta um comportamento apropriado nas condições fermentativas (ATTFIELD, 1997; SILVA-FILHO et al., 2005).

Uma maneira de obter a levedura resistente aos estresses encontrados na fermentação com alto teor alcoólico é realizar a adaptação da levedura. A adaptação tem como base o cultivo sucessivo da levedura em concentrações crescentes de um composto tóxico ou fator de estresse (SAUER, 2001).

A adaptação pode ser realizada de três maneiras: A primeira consiste em selecionar colônias mais adaptadas às condições crescentes de compostos tóxicos em placas de Petri. Na segunda maneira a levedura é submetida a fermentação por batelada e ao término do processo, a levedura é separada do vinho e inoculada em um novo mosto mais concentrado. Enquanto, a terceira maneira é realizada a fermentação contínua, sendo empregada a alimentação do mosto com concentrações crescentes (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Durante o processo de adaptação a levedura ajusta sua atividade metabólica levando a expressão de fenótipos desejáveis para suportar os efeitos estressantes para permanecer no meio por um longo período (ZHAO; BAI, 2009). De acordo com PEREIRA et al. (2012), a adaptação da levedura às altas concentrações de etanol no meio permite prevenir a redução da viabilidade celular, aumentar a produção de biomassa, e promover aumento dos teores de glicerol e trealose produzidos pela levedura.

REFERÊNCIAS

ALDIGUIER, A.S; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; GUILLOUET, S.E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 26, n. 4, p. 217-222, 2004.

ALEXANDRE H; CHARPENTIER C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 20, p. 20–27, 1998.

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB – Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.3, n.1, p. 42-49, 1984.

ANSANAY-GALEOTE, V.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SABLAYROLLES, J. M. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 9, p. 677–681, 2001.

ARATONO, M.; TOYOMASU, T.; VILLENEUVE, M.; UCHIZONO, Y.; TAKIUE, T.; MOTOMOURA, K.; IKEDA, N. Thermodynamic study on the surface formation of the mixture of water and ethanol. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, n. 1, p. 146–153, 1997.

ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C.; AICARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. Genome structure of *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*. V. 19, p. 2258-2270, 2009.

ARRUDA, G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analítica**, n.26, p. 56-62, 2007.

ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

AUESUKAREE, C.; DAMNERNSAWAD, A.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; BOONCHIRD, C.; KANEKO, Y.; HARASHIMA, S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Genetics**, v. 50, n. 3, p. 301–310, 2009.

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

BAI, F.W., CHEN, L.J., ZHANG, Z., 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**; v.110, p. 287–293, 2004.

BARBOSA, H. S. **Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular**. 2013. 92p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. (Ed.). **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, cap. 4, p. 38-85, 1996.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. in: M.A. Dos Santos Bernardes (Ed.), **Biofuel production – recent developments and prospects**. p. 85-100, 2011.

BASSO, L.C.; CARTE, C.L.; SILVESTRINI, C.; PAULILLO, S.C.L.; LUCATTI, L.; COSTA, V.M. Estudo comparativo entre a levedura “turbo” e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba: ESALQ/USP, v. 23, p. 12-25, 2003.

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

BNDES/CGEE. **Bioetanol de Cana-De-Açúcar: Energia para o desenvolvimento Sustentável**. BNDES, p.78-81. 2008.

CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, n. 12, p. 2415-57, 2007.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2ª ed. UFLA, Lavras, p.445, 2006.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, D.F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.18, n. 2, p. 40-46, 1998.

CERESCO NUTRITION. Sílica⁺ boost the efficiency of feed additives. Disponível em: <<https://ceresconutrition.com/silica-plus/>>. Acesso em 04 de maio de 2020.

DECAUX, C. Activated silicon dioxide to achieve a synergistic effect in pigs. **International Pig Topics**. v. 32, n. 1, p. 25, 2017.

DOĞAN, A.; DEMIRCI, S.; AYTEKIN, A. O.; ŞAHİN, F. Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 28-42, 2014.

DU, X.; TAKAGI, H. N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 1343–1351, 2007.

ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**. v.3, 2003.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

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**, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

GROAT, M.; OUGH, C. S. Effects of insoluble solids added to clarified musts on fermentation rate, wine composition, and wine quality. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 29, 1978

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

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnology**, New York, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HEANEY, P. J.; BANFIELD, L. A Structure and chemistry of silica, metal oxides, and phosphates. **Health Effects of Mineral Dusts, Mineralogical Society of America**, v. 28, p. 185-233, 1993.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: (Ed.). **The alcohol textbook**. 3rd. ed: UK: Nottingham University Press. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, 1999.

INOUE, T.; Wang, Y.; Jefferies, K.; Qi, J.; Hinton, A.; Forgac M. Structure and regulation of the V-ATPases. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 37, n. 6, p. 393–398, 2005.

JOHN, G. S. M. et al. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 100–105, 2012.

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

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

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, Cap. 1, p. 1-40, 2001.

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

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

MILLAR, D. G.; GRIFFITHS-SMITH, K.; ALGAR, E.; SCOPES, R. K. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 55, n. 9, p. 601–606, 1982.

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.**, 28, 817– 830, 2010.

NEWMAN, R. H. Fine biogenic silica fibres in sugar cane: a possible hazard. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 365–370, 1986.

NUANPENG, S.; LAOPAIBOON, L.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 14, n.1, p. 1-12, 2011.

ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G.J. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1810, n. 10, p. 933-944, 2011.

PARMAR, J. H.; BHARTIYA, S.; VENKATESH, K. V. Characterization of the adaptive response and growth upon hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 4, p. 1138–1148, 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**, v. 34, p. 45-53, 2012.

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

RABOVSKY, J. Biogenic amorphous silica. Scand. 1. **Scandinavian Journal or Work Environment Health**, v. 21, n. 2, p. 108-110, 1995.

- REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Improvement of ethanol production in very high gravity (VHG) fermentation by horse gram (*Dolichos biflorus*) flour supplementation. **Letter Applied Microbiology**, v. 41, p. 440 – 444, 2005.
- ROCHA, J.; BUCKERIDGE, M. Biofuelling the future. **New Scientist**, London, v. 202, n. 2709, p. 26-26, 2009.
- ROSS, M.; NOLAN, R.P.; LANGER, AM.; COOPER, W. C. Health effects of mineral dusts other than asbestos. **Health Effects of Mineral Dusts, Mineralogical Society of America**, v. 28, p. 361-407, 1993.
- RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). **The alcohol textbook**. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: Nottingham University Press. Understanding yeast fundamentals, 2003.
- SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 130-166, 2001.
- 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.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Technology**. v. 11, p. 109-123, 2009.
- SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I. M.; VENKATESWAR RAO, L. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresource Technology**. v. 72, n. 1, p. 43–46, 2000.
- SRIDEE, W.; LAOPAIBOON, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. The use of dried spent yeast as a low-cost nitrogen supplement in ethanol fermentation from sweet sorghum juice under very high gravity conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 14, n.6, p. 1-15, 2011.
- STEVENS, T. H; FORGAC, M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. **FEBS Letters**, v. 440, n. 3, p. 258–263, 1998.
- TAHERZADEH, M.J., ADLER, L. & LIDÉN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol — a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 53-66, 2002.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environment Microbiology**, v. 60, p. 1519-1524, 1994.

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

TORIJA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M. MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 47-53, 2003.

TRAN, S. T.; BOWMAN, M. E.; SMITH, T. K. Effects of silica-based feed supplement on performance, health and litter quality of growing turkeys. **Poultry Science**, v. 94, n. 8, p. 1902-1908, 2015.

UMAMAHESWARI, T.; SRIMEENA, N.; VASANTHI, N.; CIBICHAKRAVARTHY, B.; ANTHONIRAJ, S.; KARTHIKEYAN, S. Silica as biologically transmuted source for bacterial growth similar to carbon .; **Matters Archive**, p. 4–8, 2016.

VAN DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n.3-4, p.199-224. 1986.

VILLOTA, R.; HAWKES, J. G. Food applications and the toxicological and nutritional implications of amorphous silicon dioxide. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 289–321, 1986.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. 1.ed. Chichester: John Willey, p. 350, 1998.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**. v. 19, p. 201-223, 2001.

WEINZIERL, D.; LIND, A.; KUNZ, W. Hollow SiO₂ Microspheres Produced by Coating Yeast Cells. **Crystal Growth & Design**, v. 9, p. 2318-2323, 2009.

ZABED, H.; FARUQ, G.; NARAYAN SAHU, J.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; BOYCE, A. N. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**. p. 1-11, 2014.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 144, p. 2,2009.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dessa dissertação são apresentados em artigos.

Para verificar o efeito da sílica ativada sobre fungos, especialmente em *Saccharomyces cerevisiae*, foi realizado um estudo apresentado no artigo 1 (Fermentações com altos teores alcoólicos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em meio suplementado com sílica⁽⁺⁾). Esse artigo mostra que a sílica ativada, presente no meio fermentativo, minimiza os efeitos estressantes que a fermentação com alto teor alcoólico proporciona sobre a levedura, permitindo ter reflexos positivos na fermentação. Porém, a levedura utilizada *Saccharomyces cerevisiae* Y 904 não se adaptou às condições de alto teor alcoólico com o decorrer dos ciclos fermentativos. Desta forma, foi realizado um novo estudo apresentado no artigo 2 (Efeito protetor da sílica ativada na adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®] em fermentações com altos teores alcoólicos) utilizando condições experimentais semelhantes, porém empregando uma linhagem mais robusta como a *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®]. Neste estudo, foi demonstrado que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®] foi capaz de se adaptar às fermentações com altos teores alcoólicos e a sílica⁽⁺⁾ em concentrações de 100 e 300 mg L⁻¹ apresentou efeito protetor sobre a levedura.

4.1 Artigo 1- FERMENTAÇÕES COM ALTOS TEORES ALCOÓLICOS UTILIZANDO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y904 EM MEIO SUPLEMENTADO COM SÍLICA ATIVADA

RESUMO

A fermentação com alto teor alcoólico (“*Very High Gravity VHG*”) é uma tecnologia que utiliza mostos com concentrações de açúcares maiores que 25 %, com a finalidade de obter vinhos com teores alcoólicos, maiores que 15%. Quando a levedura é exposta ao alto teor alcoólico o seu estado fisiológico é alterado. O etanol altera os fosfolipídios e ácidos graxos insaturados presentes na membrana celular, promovendo o aumento na permeabilidade e fluidez de íons H⁺ ocasionando a desidratação celular. Desta maneira, a sílica pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos estressantes causados pelo alto teor de álcool na levedura. O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da sílica ativada na fermentação com alto teor alcoólico, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y 904. Para tal, foi conduzido um experimento com três tratamentos: T1- Mosto controle sem suplementação de sílica⁽⁺⁾; T2- Mosto com suplementação de sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e T3- Mosto com suplementação de sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹. O mosto esterilizado foi obtido a partir de xarope, com concentração inicial de 181,9 g L⁻¹ de ART. Para iniciar a fermentação foram inoculadas 3% (m v⁻¹) de *Saccharomyces cerevisiae*, Y904, desidratadas vivas, em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de mosto

estéril. A fermentação foi realizada sob agitação (120 rpm) e temperatura (30°C) constantes. Após o fim da fermentação, o vinho foi centrifugado sob 3925 g por 10 minutos para separar o levedo do sobrenadante, sendo o levedo utilizado no próximo ciclo fermentativo. Ao todo foram realizados 5 ciclos fermentativos, onde os mostos apresentaram as seguintes concentrações de ART (181,9; 198,1; 219,6, 239,5 e 260,5 ART g L⁻¹). Em conclusão, a sílica⁽⁺⁾ (100 e 300 mg L⁻¹) minimiza o efeito causado pela alta concentração de etanol no meio sobre a levedura, permitindo ter reflexos positivos sobre a fermentação. Porém, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Y 904, não consegue se adaptar às condições de alto teor alcoólico, obtendo assim baixa viabilidade e biomassa celular.

Palavras-chave: Biomassa, Etanol, estresse osmótico, levedura

ABSTRACT

High alcohol fermentations using *Saccharomyces cerevisiae* Y904 in medium supplemented with activated silica

Very high gravity fermentation (“Very High Gravity VHG”) that uses wort with sugar concentrations greater than 25%, in order to obtain wines with alcoholic contents, greater than 15%. When yeast is exposed to a high alcohol content, its physiological state is changed. Ethanol alters phospholipids and unsaturated fatty acids present in the cell membrane, promoting an increase in the permeability and fluidity of the H⁺ ions, causing cellular dehydration. Thus, silica appears as an alternative to minimize the stressful effects caused by the alcohol content in yeast. The purpose of this work was to verify the effect of activated silica in fermentation with high alcohol content, using *Saccharomyces cerevisiae*, strain Y 904. In summary, three treatments were performed in this experiment: Control wort without silica⁽⁺⁾ supplementation; T2- Wort with silica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ supplementation and T3- Wort with silica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ supplementation. The sterilized wort used was obtained from the syrup, with an initial concentration of 181,9 g L⁻¹ of ART. To initiate the fermentation, 3% (m v⁻¹) of *Saccharomyces cerevisiae* Y904, active dry yeast, were inoculated in 500 mL Erlenmeyers containing 200 ml of sterile wort. The Fermentation was carried out under constant agitation (120 rpm) and temperature (30 °C). After the fermentation was finished, the wine was centrifuged under 3925 g for 10 minutes to separate the yeast from the supernatant, the yeast being used in the next fermentation cycle. Overall, 5 fermentative cycles were carried out, with the following wort concentration (181,9; 198,1; 219,6, 239,5 and 260,5 g L⁻¹of ART). The silica⁽⁺⁾ supplementation (100 and 300 mg L⁻¹) minimize the effect caused by the high concentration of ethanol in the yeast medium, allowing positive reflexes on the fermentation. However, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Y 904, is unable to adapt to the conditions of high alcohol content, thus obtaining low viability and cell biomass.

Keywords: Biomass; ethanol, osmotic stress, yeast

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a demanda energética mundial por fontes renováveis como alternativas ao uso de combustíveis fósseis tem se apresentado como uma forma promissora para reduzir a emissão dos gases do efeito estufa. No Brasil as principais fontes de energia renovável são as biomassas, sendo a mais utilizada a cana-de-açúcar. (MORAES et al., 2017).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e segundo maior produtor de etanol no mundo. O que torna o país um dos principais produtores e exportadores de etanol é a presença de grandes áreas cultiváveis, assim como o clima favorável (UNICA, 2020). O processamento da cana-de-açúcar para obtenção de álcool gera vários subprodutos ou resíduos, como por exemplo: o bagaço, a torta de filtro e a vinhaça. (CASTRO, 2013). A vinhaça é empregada como fertilizante nas áreas agrícolas no entorno das usinas. No entanto, essa pode apresentar alto poder poluidor, pois apresenta elevada carga de matéria orgânica e elevada concentração de sais e ácidos orgânicos (BARBOSA et al., 2012).

A fermentação com alto teor alcoólico (“*Very High Gravity VHG*”) é uma tecnologia que pode reduzir o volume de vinhaça produzido pela metade (THOMAS et al., 1996). A VHG utiliza mostos com mais de 25 % de açúcares totais com a finalidade de obter vinhos com teores alcoólicos maiores que 15%. (BAYROCK; INGLEDEW, 2001). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* para ser empregada na fermentação com alto teor alcoólico deve responder às condições de estresse e se adaptar aos fatores ambientais através do ajuste de suas atividades metabólicas (ZHAO; BAI, 2009).

A sílica surge como uma alternativa para minimizar os efeitos estressantes apresentados no meio fermentativo. Sendo que, a sílica é um composto com mais de 98% de dióxido de silício (SiO_2) e quando submetida a um tratamento eletromagnético torna-se ativada (sílica⁽⁺⁾) (DECAUX, 2017). A sílica vem sendo utilizada para gerar efeito protetor aos microrganismos por reduzir o estresse oxidativo, aumentar o oxigênio dissolvido e aumentar a absorção de amônia (THOMAS et al., 1994; UMAMAHESWARI, et al., 2016).

O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da sílica ativada na fermentação com alto teor alcoólico, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y 904.

MATERIAL E MÉTODOS

Substrato

O preparo do mosto foi realizado a partir de xarope de cana-de-açúcar como matéria-prima obtido de uma usina de açúcar e álcool da região de Piracicaba/SP. Em um galão de 5 L o xarope foi diluído em água destilada até atingir a concentração de açúcar redutor total (ART) de 261,2 g L⁻¹ e o volume de 4 L. O xarope diluído foi clarificado através da adição de 10,0 g L⁻¹ de fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄.H₂O). Em seguida, em autoclave, o material foi aquecido até 121 °C, sob 1 atm e mantido sob estas condições por 15 minutos. O xarope diluído foi resfriado e mantido em repouso por 48 horas, para decantar os colóides em suspensão. Após o repouso, o sobrenadante do xarope diluído foi sifonado e acondicionado em um galão de vidro de 5 L. A concentração de açúcares redutores totais (ART) foi ajustada, com adição de água destilada, até 260,5 ART g L⁻¹. Para preparar os mostos de cada ciclo fermentativo, o xarope foi suplementado com 100 mg L⁻¹ de uréia e posteriormente diluído com água destilada até atingir a concentração de açúcar desejada (181,9; 198,1; 219,6 e 239,5 ART g L⁻¹). Em seguida, os mostos foram esterilizados em autoclave sob temperatura de 121 °C, durante 20 minutos e sob 1 atm (BRAGA, 2006).

Tratamentos

Foram realizados neste experimento três tratamentos conforme descrito na Tabela 1, cada tratamento teve 4 repetições em cada ciclo fermentativo.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos realizados quanto a concentração de açúcar, concentração de uréia suplementada e tratamentos aplicados durante os 5 ciclos fermentativos no experimento.

Tratamentos	Ciclo fermentativo	Açúcar (g L ⁻¹)	Uréia (mg L ⁻¹)
Controle (T1)	1° Ciclo	181,9	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	2° Ciclo	198,1	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	3° Ciclo	219,6	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	4° Ciclo	239,5	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	5° Ciclo	260,5	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			

Condução dos ensaios de fermentação

Para dar início a fermentação foram inoculadas 3% (massa seca) de *Saccharomyces cerevisiae* Y904 (AB Brasil) em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de mosto estéril, com 181,9 g ART L⁻¹ e seus respectivos tratamentos conforme a Tabela 1. A fermentação foi conduzida em *shaker*, marca Infors HT[®], modelo minitron, sob agitação (120 rpm) e temperatura (30°C) constantes. Ao término do processo fermentativo, o vinho foi centrifugado sob 3925 g por 10 minutos, utilizando uma centrífuga refrigerada Marca Thermo Scientific[®]

modelo Sorvall ST 40R, para separar o levedo do sobrenadante. O vinho de levedurado foi armazenado em recipientes de plástico de 200 mL para posterior análises físico-químicas e as leveduras foram reutilizadas em novo ciclo. Ao todo foram realizados 5 ciclos fermentativos (COPERSUCAR,1987).

Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi determinada através da coloração diferencial das células em solução de azul de metileno 0,1%. Para essa análise, as amostras de leveduras foram diluídas 20 vezes, acondicionada em câmara de *Neubauer* e visualizadas em microscópio óptico, marca Nikon®, Modelo E 200. As células de leveduras visualizadas vivas apresentavam-se incolores e as células mortas eram visualizadas coradas com o azul de metileno, conforme metodologia descrito por PIERCE (1970).

Biomassa celular

Ao fim de cada ciclo fermentativo foi determinado o volume do vinho presente no reator com o auxílio de uma proveta graduada de 500 mL. Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação sob 3925 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o volume do sobrenadante foi medido em uma proveta graduada de 500 mL e por diferença foi determinado o volume de creme de levedura. A partir desses dados do volume de creme de leveduras foi estimada a concentração de leveduras (gramas de matéria seca por litro de vinho) de acordo coma metodologia descrita por KOSHIMIZU et al (1982).

Determinação de açúcares totais e glicerol

As concentrações de glicose, frutose, sacarose e glicerol presentes nos mostos e nos vinhos, durante os ciclos fermentativos, foram determinadas utilizando um cromatógrafo de íons, modelo IC 930, da marca Metrohm®. Para essas análises, foi utilizado o seguinte sistema cromatográfico: coluna cromatográfica, modelo Metrosep Carb 1 – 150/4.0; detector amperométrico; solução de eluente de hidróxido de sódio 200 mM e o fluxo de 1,0 mL min⁻¹.

A temperatura da coluna foi mantida em 35 °C (EITH et al.; 2006). As amostras foram diluídas e filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45µm. Para cada análise foram injetados 0,25 µL da amostra e o tempo da corrida cromatográfica foi de 9 minutos.

Determinação do Teor Alcoólico

Para determinar o teor alcoólico foram coletados 25 mL do vinho sem a levedura de cada unidade experimental. Esse volume foi transferido para a célula de alimentação de um destilador para álcool, Modelo TE-010 (marca Tecnal®) e destilado por arraste em vapor, recolhendo-se 25 mL do destilado, em balão volumétrico. As amostras dos destilados foram analisadas quanto ao teor alcoólico em um densímetro marca Schimidt Haensch®, modelo EDM 5000 em temperatura de trabalho de 20 °C com desvio de 0,1°C (ZAGO et al.; 1996).

Rendimento fermentativo

O cálculo do rendimento fermentativo foi realizado com base na estequiometria da fermentação alcoólica, na qual o rendimento de 100% ocorre quando há a formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir da fermentação de 100g de açúcares redutores totais. Assim, o rendimento fermentativo foi calculado de acordo com a Equação 4 (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT, 1990).

$$RF = \frac{g \text{ de etanol no vinho}}{g \text{ de ART no mosto} \times 0,5111} \times 100$$

(Eq. 1)

Produtividade de fermentação

A produtividade foi calculada com base na concentração alcoólica do vinho ao final da fermentação e no tempo de fermentação. A produtividade de fermentação (PF) foi calculada por meio da Equação 5 (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT, 1990).

$$PF = \frac{\text{Concentração de etanol no vinho (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}}$$

(Eq. 2)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade celular

Avaliando a viabilidade celular das leveduras submetidas ao tratamento controle, durante os 5 ciclos fermentativos, foi possível observar que a viabilidade celular das leveduras submetidas ao Tratamento controle (T1) aumentou de 74,0 % para 81,3 % durante o primeiro ciclo fermentativo. Sendo que, isso indicou aumento de 7,3% da viabilidade celular. No entanto, a viabilidade celular da levedura decaiu, à medida que, a concentração de açúcar no mosto foi aumentando. Dessa maneira, a redução da viabilidade celular de um ciclo fermentativo para o outro foi de: 17,4% do final do 1º para o 2º ciclo; 5,9% do 2º para o 3º ciclo; 8,3% do 3º para o 4º ciclo e 9,2% do 4º para o 5º ciclo (Figura 4).

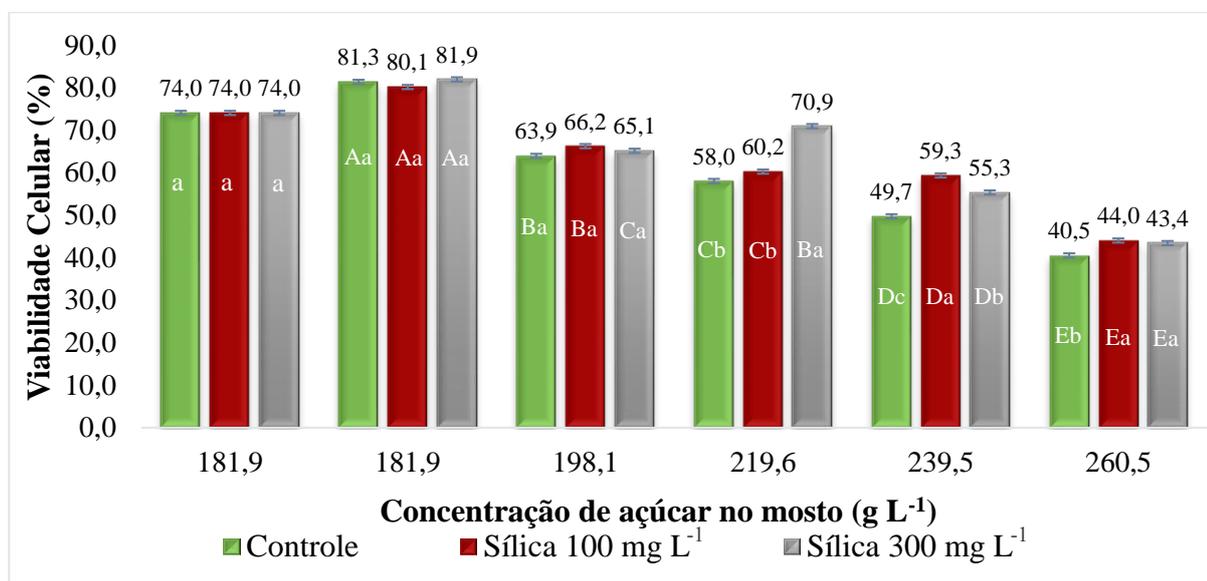


Figura 4. Viabilidade celular das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Comportamento similar foram encontrados nas leveduras submetidas ao tratamento Sílica⁽⁺⁾ 100 mgL⁻¹ (T2). Sendo que, do início do 1º ciclo (74,0%) até o final do 1º ciclo (80,1%) houve aumento da viabilidade celular de 6,1%. Enquanto, a partir do segundo ciclo fermentativo a viabilidade celular das leveduras também decaiu com o aumento da concentração de açúcar no mosto. Desse modo, a redução da viabilidade celular de um ciclo fermentativo para o outro foi de: 13,9% do final do 1º para o 2º ciclo; 6,0% do 2º para o 3º ciclo; 0,9% do 3º para o 4º ciclo e 15,3% do 4º para o 5º ciclo.

Por outro lado, as leveduras submetidas ao tratamento Sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ (T3) apresentaram aumento na viabilidade celular do início do 1º ciclo (74,0%) até o final do 1º ciclo (81,9%), isso representou aumento de 7,9 % da viabilidade celular inicial. Enquanto, no final do 2º ciclo foi encontrada redução na viabilidade celular de 16,8 % em relação ao 1º ciclo. No entanto, ao término do 3º ciclo foi verificado aumento na viabilidade celular (70,9%) de 5,8%, o que não foi verificado nos demais tratamentos. Contudo, ao final do 4º ciclo as leveduras apresentaram redução na viabilidade celular de 15,6% em relação ao 3º ciclo. Assim como, no final do 5º ciclo houve redução da viabilidade celular de 11,9% em relação ao 4º ciclo.

Dessa maneira, foi possível observar que a viabilidade celular decaiu com o passar dos ciclos fermentativos, isso só não aconteceu do 2º ciclo ao 3º ciclo do tratamento com Sílica⁽⁺⁾ 300 mgL⁻¹. BAYROCK; INGLEDEW (2001) e TONOLI (2017), utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em mostos contendo 50-280 g L⁻¹ de sacarose verificaram que a viabilidade celular da levedura diminuiu com o aumento da concentração de açúcar no meio ao longo de 9 ciclos fermentativos. Isso mostra que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 consegue realizar a fermentação alcoólica em condições de estresses, porém não é capaz de manter alta viabilidade durante os ciclos celulares. Uma vez que, o estresse que a levedura é submetida supera a capacidade de adaptação das células e muitas delas não toleram a condição imposta e morrem (SIDERIUS; MAGER, 2002).

Analisando os efeitos dos tratamentos ao longo dos 5 ciclos fermentativos foi possível verificar que, ao término do 1º ciclo de fermentação as leveduras submetidas aos 3 tratamentos não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre si. Assim como, no final do 2º ciclo fermentativo, as leveduras cultivadas nas condições dos 3 tratamentos também não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre si. No entanto, ao término do 3º ciclo de fermentação, as leveduras submetidas às condições do tratamento T3 apresentaram a maior viabilidade celular (70,9 %) entre todos os tratamentos. Sendo que, o tratamento T3 promoveu

aumento na viabilidade celular de 12,9% em relação ao T1 e de 10,7 % ao T2. Contudo, ao final do 4º ciclo fermentativo as leveduras submetidas ao tratamento T2 apresentaram a maior viabilidade celular (59,3 %) entre todos os tratamentos. Desse modo, o tratamento T2 ocasionou aumento na viabilidade celular de 9,6 % em relação ao T1 e 4,0 % ao T3. Enquanto, o tratamento T3 (55,3%) proporcionou aumento na viabilidade celular de 5,6% em relação ao T1. Todavia, ao término do 5º ciclo fermentativo as leveduras cultivadas nas condições do tratamento T2 apresentaram a maior viabilidade celular (44,0%) entre todos os tratamentos. Consequentemente, o tratamento T2 possibilitou o aumento da viabilidade celular de 3,5 % em relação ao T1. Porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos T2 e T3. No entanto, o tratamento T3 (43,4%) promoveu aumento na viabilidade celular de 3,4 % em relação ao T1.

Dessa forma, foi possível observar que durante os 1º, 2º e 3º ciclos fermentativos o tratamento com Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ (T3) promoveu o maior aumento na viabilidade celular entre os tratamentos, enquanto nos 4º e 5º ciclos fermentativos o tratamento com Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ (T2) proporcionou o maior aumento na viabilidade celular entre os tratamentos. Em todos os ciclos fermentativos o tratamento com Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ (T3) ofereceu condições que permitiram observar maiores viabilidades celulares das leveduras do que a condição de estudo controle (Tratamento T1). O aumento da viabilidade celular proporcionado pela sílica ⁽⁺⁾ pode ser explicado pela atuação da mesma sobre o potencial iônico da levedura. Uma vez que, o etanol interfere na integridade da membrana celular e promove o aumento na permeabilidade e fluidez de alguns íons, levando à dissipação do potencial eletroquímico e, posteriormente, acidificação intracelular e vacuolar (DECAUX, 2017; VAN UDEN, 1985).

Biomassa celular

No início dos ensaios de fermentação, início do 1º ciclo, todos os tratamentos iniciaram com a mesma concentração de biomassa de leveduras (6 g L⁻¹). As leveduras expostas às condições do tratamento controle quando submetidas aos mostos com concentrações de açúcares de 198,1 g L⁻¹; 219,6 g L⁻¹; 239,5 g L⁻¹ e 260,5 g L⁻¹ de ART não conseguiram se adaptar as condições de estresse ao meio (alta concentração de etanol), o que resultou na redução da biomassa celular. Desse modo, foi possível observar que as leveduras apresentaram, respectivamente, redução na biomassa celular de 3,8g L⁻¹; 1,2g L⁻¹; 0,7g L⁻¹ e 0,6g L⁻¹ em relação ao ciclo anterior (Figura 5).

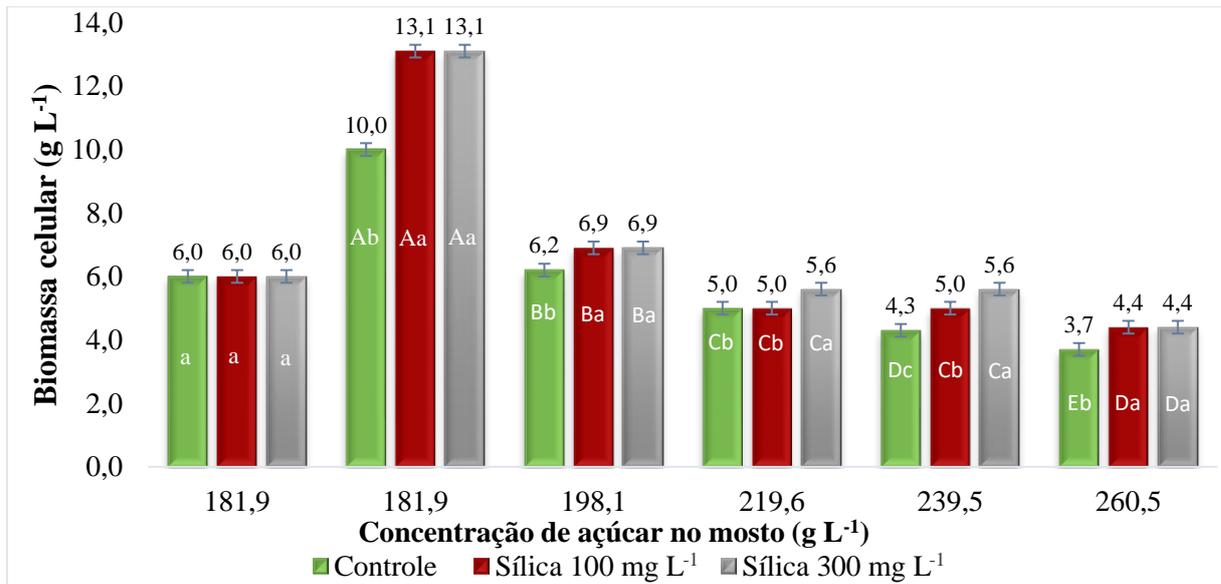


Figura 5. Biomassa celular das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Enquanto, as leveduras submetidas às condições do tratamento Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ também não se adaptaram ao meio, de forma a aumentar sua biomassa celular. Sendo assim, foi observado que as leveduras submetidas aos mostos com concentrações de açúcar de 198,1 g L⁻¹; 219,6 g L⁻¹ e 260,5 g L⁻¹ de ART; apresentaram, respectivamente, redução na biomassa celular de 6,2 g L⁻¹; 1,9 g L⁻¹ e 0,6 g L⁻¹ em relação ao ciclo anterior. Todavia, no 4º ciclo as leveduras submetidas a fermentação com mosto de 239,5 g L⁻¹ de ART não apresentaram redução na biomassa e celular, isso significou que a Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ pode ter minimizado os efeitos estressantes presentes no meio fermentativo.

Comportamento semelhante foi observado nas leveduras submetidas às condições do tratamento Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹. No qual, foi observado que as leveduras expostas as condições de fermentações em mostos com concentrações de açúcares de 198,1 g L⁻¹; 219,6 g L⁻¹ e 260,5 g L⁻¹ apresentaram, respectivamente, redução na biomassa celular de 6,2 g L⁻¹; 1,3 g L⁻¹ e 1,2 g L⁻¹. Contudo, também foi verificado que no 4º ciclo as leveduras foram submetidas a fermentação com mosto de 239,5 g L⁻¹ de ART e no final do processo não apresentaram redução de biomassa celular.

Desta forma, foi possível observar que durante o 1º ciclo fermentativo de todos os tratamentos a produção de biomassa final aumentou em relação a biomassa inicial. No entanto, quando as leveduras foram submetidas ao reciclo celular, as biomassas celulares de todos os tratamentos foram reduzidas. Contudo, isso só não aconteceu e do 3º ciclo ao 4º ciclo dos tratamentos com Sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e Sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹. De acordo com BASSO et al. (2011), é estimado que durante o reciclo celular de fermentação a biomassa da levedura aumente de 5 a 10% em relação a sua biomassa inicial, sendo que, isso não foi observado no presente trabalho. Isso pode ser devido a linhagem da levedura não ter a capacidade de se adaptar ao meio que apresenta condições adversas. No entanto, leveduras de linhagens mais robustas como a *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e CAT-1 se adaptam e conseguem aumentar a proliferação celular como mostrado nos trabalhos de FURLAN (2012) e VITOR, (2014).

Analisando os efeitos dos tratamentos sobre as leveduras ao longo dos ciclos fermentativos, foi possível observar que no 1º ciclo fermentativo os tratamentos T2 e T3 promoveram, respectivamente, aumento na formação de biomassa de 31,0% em relação ao T1. Assim como, no 2º ciclo fermentativo os tratamentos T2 e T3 proporcionaram, respectivamente, aumento na formação de 11,3 % em relação ao T1. No entanto, no 3º ciclo de fermentação o tratamento T3 proporcionou aumento na produção de biomassa de 12,0% em relação ao T1 e T2. Comportamento semelhante foi observado do tratamento T3 sobre as leveduras no 4º ciclo de fermentação, no qual, o T3 conferiu aumento na formação de biomassa de 30,2% em relação ao T1 e 12,0 % ao T2. Enquanto, o tratamento T2 promoveu aumento na produção de biomassa de 16,3% em relação ao T1. Contudo, no 5º ciclo fermentativo os tratamentos T2 e T3 conferiram aumento na formação de biomassa de 18,9 % em relação ao T1.

Todavia, foi possível observar que durante os 5 ciclos fermentativos o tratamento com Sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ apresentou concentração de biomassa maior do que o tratamento controle. Isso mostra que a Sílica⁽⁺⁾ pode atenuar os efeitos do etanol presente no meio. O etanol pode causar a alteração e aumentar a fluidez da membrana celular da levedura. Como consequência, ocorre a dissipação do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática diminuindo o pH intracelular (BAYROCK; INGLEDEW, 2001). Para minimizar os efeitos do etanol sobre a levedura alguns materiais particulados podem auxiliar na proteção do estresse osmótico. (HU, et al., 2003; BAFRNCOVA et al., 1999; THOMAS et al., 1994). Assim como, a adição de sílica no mosto pode reduzir o estresse osmótico sobre a célula da levedura. WEINZIERL et al. (2009) mostraram que o composto (tetraetil ortossilicato) contendo sílica, podem interagir se ligando a superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, é possível inferir que

a sílica realizou interação eletrostática com os grupos polarizados de polissacarídeos, proteínas e lipídios presentes na superfície celular da levedura, de modo, a minimizar a redução de biomassa celular durante os ciclos fermentativos.

Açúcares redutores totais residuais

Para conduzir os ensaios todos os tratamentos começaram as fermentações com a mesma concentração de açúcar. As concentrações iniciais de açúcar presente nos mostos em cada ciclo foram: 1º ciclo 181,9 g L⁻¹; 2º ciclo 198,1 g L⁻¹; 3º ciclo 219,6 g L⁻¹; 4º ciclo 239,5 g L⁻¹ e 5º ciclo 260,5 g L⁻¹ de ART. Após o fim de cada ciclo fermentativo foi possível verificar que em todos os tratamentos todo o açúcar disponível do meio foi consumido (Figura 6). Apesar de ter encontrado condições de estresse osmótico em todos os tratamentos durante os ciclos fermentativos, a levedura foi capaz de converter o açúcar em etanol, glicerol e CO₂. LAOPAIBOON et al (2009) verificou que levedura *Saccharomyces cerevisiae* NP01 em mostos contendo 236-336 g L⁻¹ de glicose e com suplementação de nitrogênio consumiu todo o açúcar. Enquanto, CRUZ (2016) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em mosto com 240 g L⁻¹ de glicose observou todo o consumo de açúcar presente. Sendo assim, os resultados obtidos em todos os tratamentos ao longo dos ciclos fermentativos no presente trabalho são similares aos encontrados na literatura.

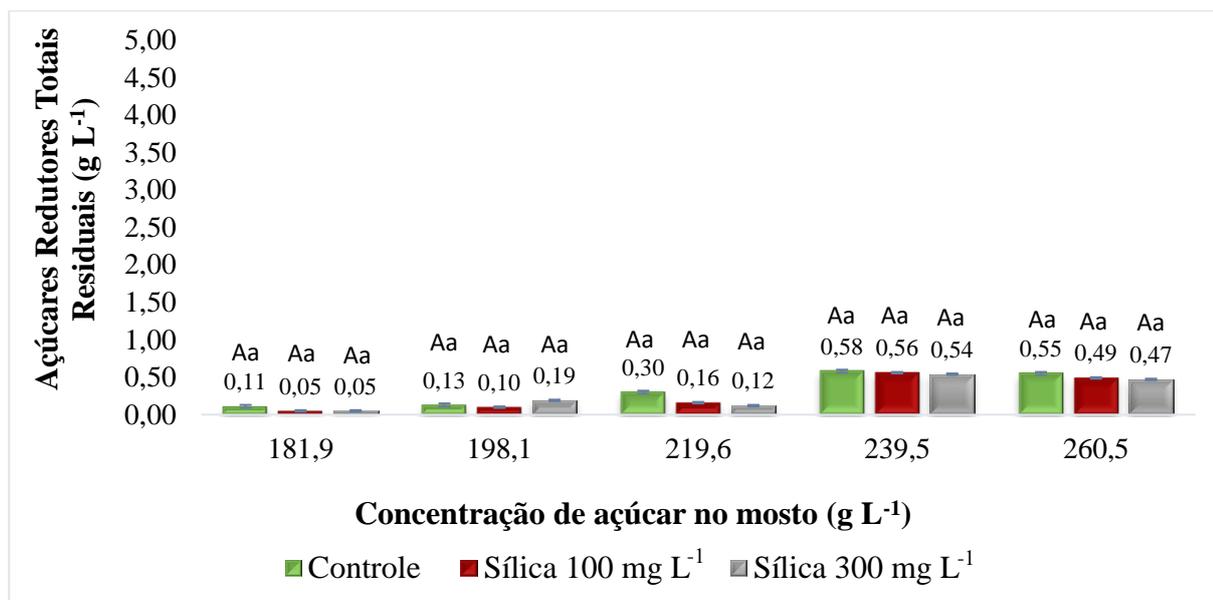


Figura 6. Açúcares redutores totais residuais presente no vinho das fermentações submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Glicerol

As leveduras submetidas ao tratamento controle apresentaram variação na produção de glicerol do 1º ao 5º ciclo de 11,19 a 14,24 g L⁻¹. Essa variação representou aumento de 27,2% do teor de glicerol total produzido pelas leveduras. Enquanto, as leveduras submetidas ao tratamento Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ apresentaram variação na concentração de glicerol do 1º ao 5º ciclo de 10,52 a 14,12g L⁻¹. Essa variação significou aumento de 34,2% do teor de glicerol total produzido pelas leveduras. No entanto, as leveduras submetidas ao tratamento Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ apresentaram variação na concentração de glicerol do 1º ao 5º ciclo de 10,76 a 13,92 g L⁻¹. Essa variação representou aumento de 29,4% do teor de glicerol total produzido pelas leveduras (Figura 7).

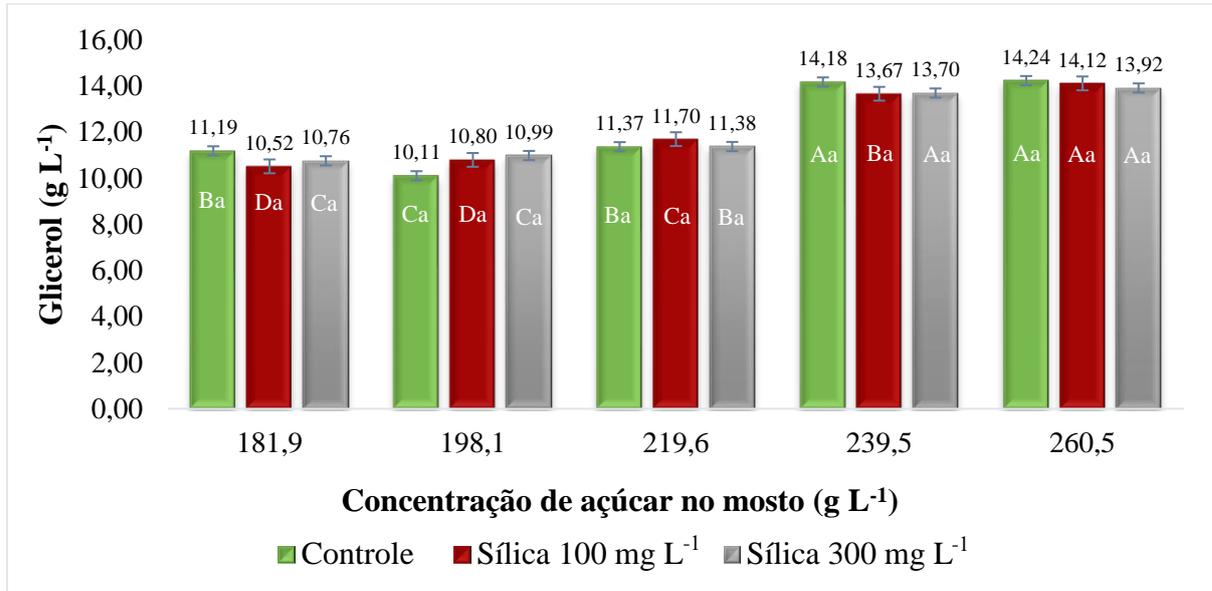


Figura 7. Glicerol produzido pelas leveduras Y904 submetidas aos tratamentos controle, sílica (+) 100 mg L⁻¹ e sílica (+) 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

No entanto, foi possível observar que em todos os tratamentos a produção de glicerol aumentou de um ciclo para o outro, isso só não aconteceu do 1º ciclo ao 2º ciclo do tratamento controle. Também foi possível verificar que após o fim de cada ciclo fermentativo não houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos quanto a formação de glicerol, o que não era esperado. O trabalho esperava que na presença da sílica (+) a produção de glicerol fosse menor, uma vez que, a sílica reduziu o efeito do etanol sobre a levedura aumentando a viabilidade e biomassa celular. Assim como, REDDY; REDDY, 2005 observaram adição de materiais particulados aos meios de fermentação reduziram a produção de glicerol pela levedura.

A presença de elevados teores de etanol no meio proporciona estresse osmótico às células de leveduras, de modo a ocasionar a desidratação celular (MA; LIU, 2010). Desta maneira, a levedura aumenta a produção de glicerol para minimizar o efeito estressante e com isso manter sua sobrevivência e proliferação celular (NEVOIGT; STAHL, 1997; PULIGUNDLA et al., 2011). Tal que, FURLAN (2012) utilizando diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto com concentração de etanol de 8-15% observou aumento de 0,5 a 1,0% do teor de glicerol produzido pelas leveduras durante 7 ciclos fermentativos. Isto

é devido ao fato de leveduras mais robustas serem capazes de manter alta viabilidade celular e pequena produção de glicerol em condições adversas (GUTIERREZ, 1991). No entanto, utilizando a mesma linhagem do presente trabalho (*Saccharomyces cerevisiae* Y904) TONOLI (2017) observou que em mostos com concentração de açúcar de 50-280g L⁻¹ o aumento da produção de glicerol de 6 a 14g L⁻¹ ao longo de 9 ciclos fermentativos.

Teor alcoólico

As fermentações realizadas sob as condições do tratamento controle (T1) apresentaram variações no teor alcoólico do 1º ao 5º ciclo de 9,6 a 15,9%. Enquanto, as fermentações realizadas sob as condições do tratamento com sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ (T2) apresentaram variações no teor alcoólico do 1º ao 5º ciclo de 10,9 a 16,0%. Comportamento semelhante na produção de etanol também foram observados nas fermentações realizadas sob as condições do tratamento sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ (T3). No qual, foram verificados variações no teor alcoólico do 1º ao 5º ciclo de 10,9 a 15,9 % (Figura 8). Desta forma, possível observar em todos os tratamentos que o teor alcoólico produzido pelas leveduras aumentou no decorrer dos ciclos fermentativos, uma vez que, a concentração de açúcar aumentou em cada ciclo celular.

Analisando os efeitos dos tratamentos sobre a produção de etanol pelas leveduras ao longo dos ciclos fermentativos, foi possível observar que durante os 5 ciclos fermentativos não houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os 3 tratamentos.

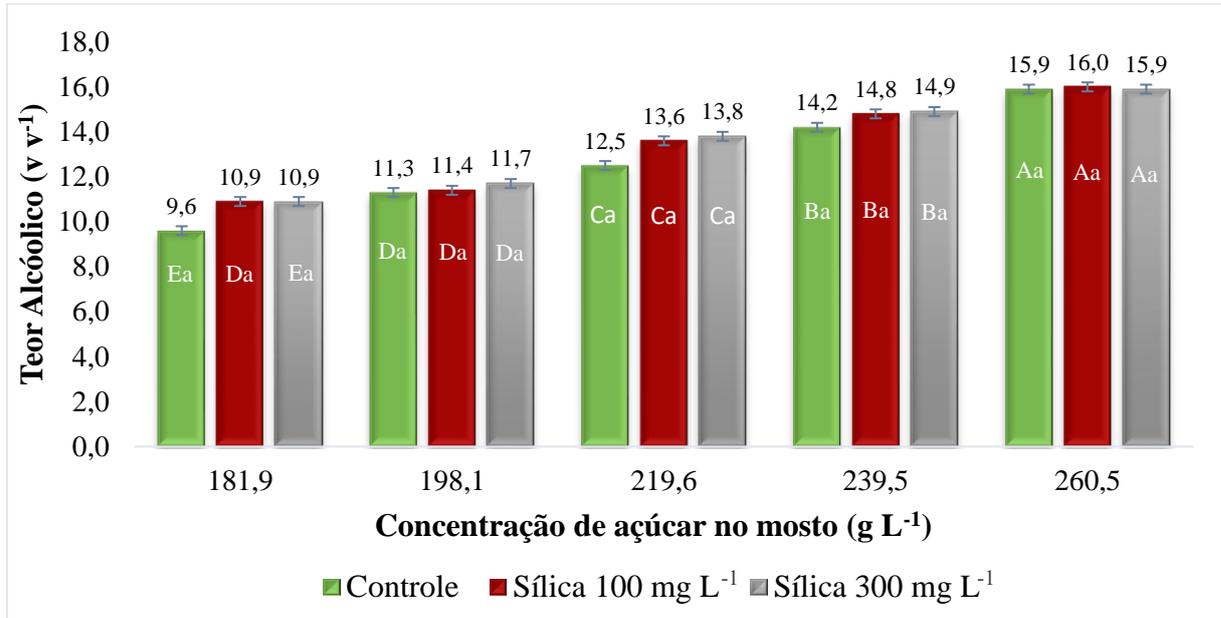


Figura 8. Teor alcoólico produzido pelas leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Em fermentações com altos teores alcoólicos (VHG) as células da levedura são expostas às mais diversas condições de estresses ambientais. Sendo que, o principal fator que proporciona o estresse osmótico na levedura é alta concentração de etanol produzido pela própria levedura, quando se conduz fermentações com elevada concentração de açúcar no mosto (SRICHUWONG et al., 2009; THOMAS et al., 1994). A alta concentração de etanol promove efeito tóxico na levedura, resultando em perda de viabilidade celular, crescimento e desempenho de fermentação da levedura (WANG et al., 2007)

Investigando o teor alcoólico produzido pelas leveduras ao longo dos 5 ciclos fermentativos, foi possível observar que o teor alcoólico encontrado neste trabalho foi maior que o encontrado no trabalho de REDDY; REDDY (2005). No qual, os autores observaram que empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em mosto contendo 300 g L⁻¹ de glicose sem suplementação de nutrientes produziu 11 % v v⁻¹ de etanol, enquanto que em meio suplementado com *Dolichos biflorusa* produção foi de 14% v v⁻¹. No entanto, os resultados dos teores alcoólicos do presente estudo foram similares aos encontrados do trabalho de CRUZ (2016).

Sendo que, CRUZ (2016) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em mosto contendo 240 g L⁻¹ de sacarose verificou o teor alcoólico de 14 % v v⁻¹.

Rendimento fermentativo

Analisando o rendimento fermentativo de cada tratamento ao longo dos ciclos fermentativos, foi possível observar que as leveduras empregadas ao tratamento controle apresentaram aumento no rendimento durante os ciclos fermentativos, enquanto as leveduras empregadas aos tratamentos com concentração de sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e 300 mg L⁻¹ mantiveram o rendimento similares após os ciclos fermentativos. Essa diferença pode ser explicada, uma vez que, as leveduras submetidas aos tratamentos com concentração de sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e 300 mg L⁻¹ já apresentaram altos rendimentos fermentativos desde o fim do 1º ciclo.

Analisando o efeito dos tratamentos ao longo dos ciclos fermentativos, foi possível observar que após o final do 1º ciclo o tratamento T2 (92,8%) promoveu aumento no rendimento fermentativo de 11,3% em relação ao T1, no entanto, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto ao T3. Porém, foi verificado que o tratamento T3 (92,5%) proporcionou aumento de rendimento de 11,0% em relação ao T1. Contudo, ao término do 2º ciclo o tratamento T3 provocou aumento no rendimento fermentativo (88,6%), de 2,4% em relação ao T1 e 1,9% ao T2. Assim como, no 3º ciclo o tratamento T3 (95,1%), promoveu aumento de 10,1% em relação ao T1, contudo, não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto ao T2. Comportamento similar foi observado no 4º ciclo, no qual, o tratamento T3 (93,9%), ocasionou aumento no rendimento de 3,9% em relação ao T1 e não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto ao T2. Todavia ao término do 5º ciclo não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

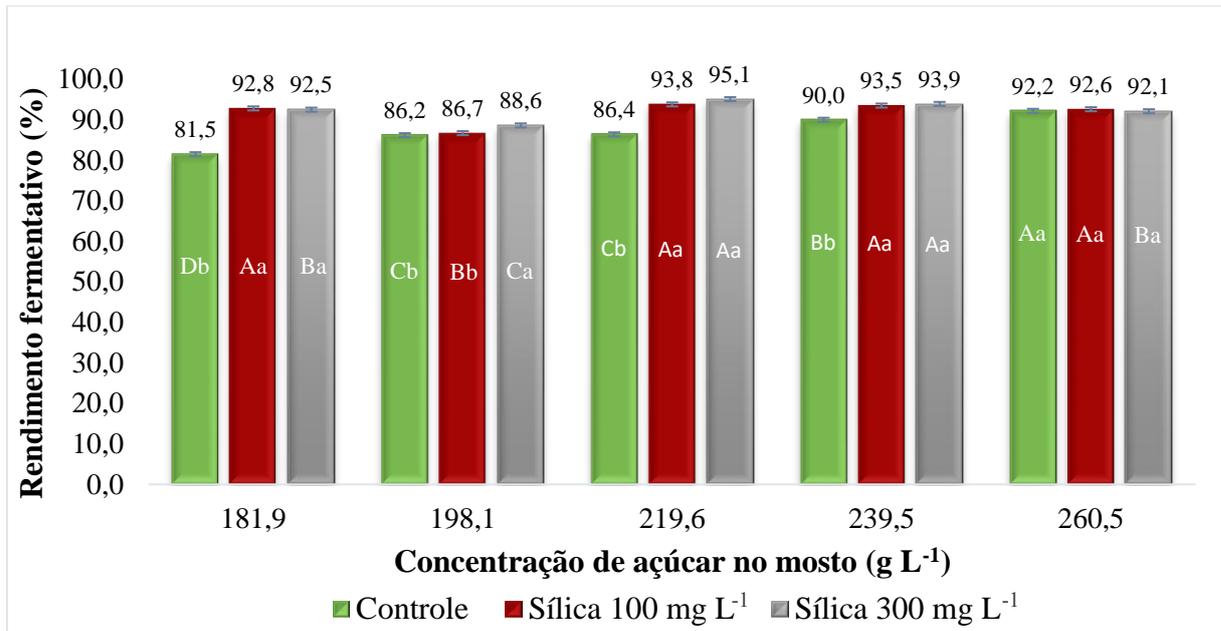


Figura 9. Rendimento fermentativo das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Ao longo dos 5 ciclos fermentativos foi possível observar que os tratamentos com Sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e Sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ promoveram rendimentos fermentativos maiores do que tratamento controle. Os resultados obtidos de rendimento em todos os tratamentos ao longo dos 1º, 2º e 5º ciclos fermentativos são similares aos encontrados na literatura. CRUZ (2019) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em mosto com 300 g L⁻¹ obteve rendimento fermentativo na faixa de 88-92%. Enquanto, ZHANG et al. (2019) empregando *Saccharomyces cerevisiae* Y-1 em mosto com 30% de açúcares redutores totais alcançou 90% de rendimento fermentativo. Assim como, FURLAN (2012) utilizando diversas cepas de leveduras em mostos com 250 g L⁻¹ de ART obteve rendimento fermentativo na faixa de 82-90%. Contudo, nos 3º e 4º ciclos foram observados que os tratamentos Sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e Sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ proporcionaram rendimentos fermentativos maiores do que aqueles normalmente encontrados na literatura.

A presença da sílica, principalmente nos 4 primeiros ciclos fermentativos, mostrou-se ser um fator importante para aumentar o rendimento fermentativo, no entanto o efeito positivo provocado sobre a levedura com o passar dos ciclos fermentativos foi diminuindo. Isso pode ser

explicado pela levedura Y 904 ser uma linhagem que não suporta muitos ciclos celulares, assim como, não se adapta muito bem às condições adversas (BASSO et al., 2008).

Produtividade de fermentação

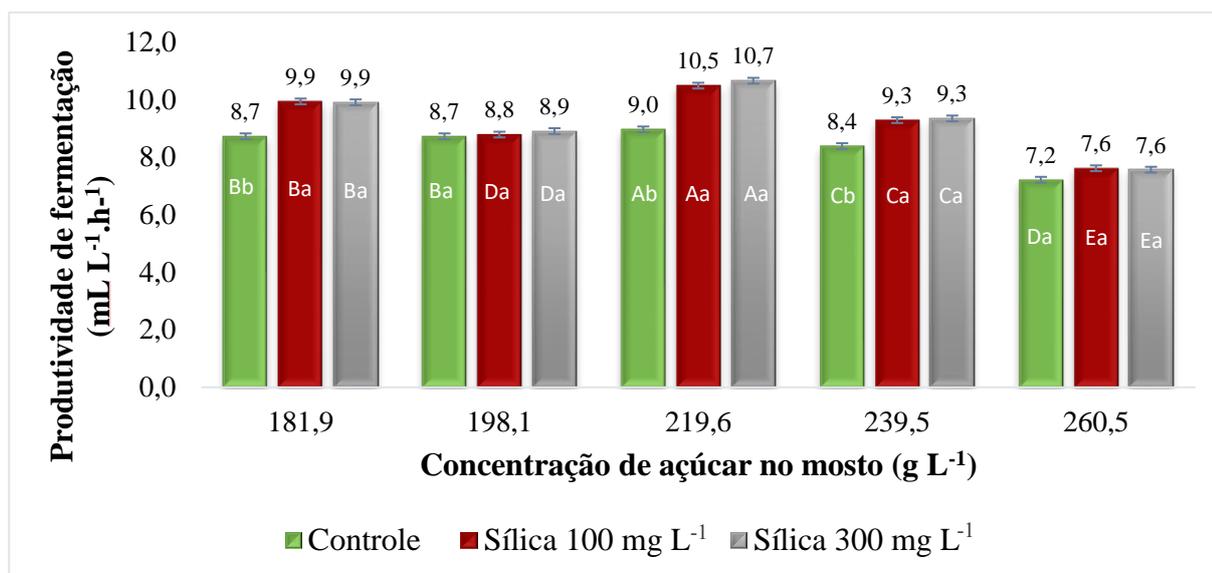


Figura 10. Produtividade de fermentação das leveduras Y 904 submetidas aos tratamentos controle, sílica (+) 100 mg L⁻¹ e sílica (+) 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

As produtividades fermentativas de todos os tratamentos apresentaram variações durante os ciclos fermentativos, porém a partir do 3º ciclo as produtividades começaram cair em todos os tratamentos até o final do 5º ciclo (Figura 10). Isso pode ser explicado pelo aumento do teor alcoólico no meio, que proporcionou condições adversas para a levedura, causando diminuição da viabilidade e biomassa celular. Esse efeito do alto teor alcoólico (15% v v⁻¹) sobre a viabilidade celular da levedura também foi observado na literatura. (BAI et al., 2004; REDDY; REDDY, 2006).

Analisando o efeito dos tratamentos ao longo dos ciclos fermentativos, foi possível verificar que após o fim do 1º ciclo, os tratamentos T2 e T3 promoveram, respectivamente, a maior produtividade fermentativa (9,9 mL L⁻¹.h⁻¹) entre os tratamentos, tal que, isso significou

aumento de 13,8% em relação ao T1. Contudo, no final do 2º ciclo, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. Enquanto, ao término do 3º ciclo foi observado que o tratamento T3 conferiu a maior produtividade fermentativa ($10,7 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) entre os tratamentos, sendo que, isso representou aumento de 18,9 % em relação ao T1, porém não representou diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao T2. Contudo, foi verificado que o tratamento T2 ($10,5 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) proporcionou aumento na produtividade de 16,7% em relação ao T1. Enquanto, no final do 4º ciclo os tratamentos T2 e T3 ($9,3 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) promoveram aumento na produtividade de 10,7% em relação ao T1. Comportamento similar foi observado ao término do 5º ciclo, no qual, os tratamentos T2 e T3 ($7,6 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) proporcionaram aumento na produtividade de 5,5 % em relação ao T1.

Os tratamentos com sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L^{-1} e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L^{-1} promoveram aumento na produtividade fermentativa em relação ao tratamento controle ao longo dos 5 ciclos fermentativos. Vale ressaltar a importância da sílica ⁽⁺⁾ em reduzir o efeito das altas concentrações de etanol do meio aumentando a produtividade fermentativa.

Os resultados obtidos nas produtividades fermentativas neste trabalho, em todos os tratamentos, durante os 5 ciclos fermentativos são superiores a alguns resultados encontrados na literatura. Como por exemplo, CRUZ (2019) utilizou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 em mosto com 300 g L^{-1} de ART e obteve produtividades fermentativas na faixa de $1,77$ - $3,20 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Assim como, JOANNIS-CASSAN et al. (2014) empregaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* C-10 em fermentações contendo 300 g L^{-1} de ART e obtiveram produtividades fermentativas entre $1,5$ a $2,3 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Essas diferenças observadas podem ser explicadas pelo fato da levedura utilizada no presente trabalho ter sido adaptada gradualmente aos altos teores alcoólicos.

Contudo, a produtividade fermentativa de todos os tratamentos após os 5 ciclos fermentativos ficou abaixo da observada por LI et al. (2009) que empregando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 obteve após 10 ciclos produtividade fermentativa de $10,62 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em mostos com 320 g L^{-1} de ART. Isso pode ser explicado pela linhagem utilizada na literatura ser uma linhagem mais robusta e conseqüentemente apta a suportar melhor às condições adversas.

CONCLUSÃO

A sílica ⁽⁺⁾ em concentrações de 100 e 300 mg L⁻¹ reduziram os efeitos causados pela alta concentração de etanol no meio sobre a levedura, permitindo ter reflexos positivos na fermentação. Porém, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y 904 não consegue se adaptar às condições de alto teor alcoólico, obtendo assim baixa viabilidade e biomassa celular. Ao longo dos 5 ciclos fermentativos, o tratamento com sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ apresentou maior viabilidade celular, biomassa, rendimento e produtividade fermentativa quando comparado com os tratamentos controle e sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹.

REFERÊNCIAS

BAI, F.W., CHEN, L.J., ZHANG, Z., 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**; v.110, p. 287–293, 2004.

BARBOSA, E. A. A.; ARRUDA, F. B.; PIRES, R. C. M.; SILVA, T. J.; SAKAI, E. Cana-de-açúcar fertirrigada com vinhaça e adubos minerais via irrigação por gotejamento subsuperficial: Ciclo da cana-planta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 952-958, 2012.

BAFRNCOVA, P.; SMOGROVICOVA, D.; SLAVIKOVA, I.; PATKOVA, J.; DOMENY, Z.Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**,v. 21, p. 337-341, 1999.

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

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. in: M.A. Dos Santos Bernardes (Ed.), **Biofuel production – recent developments and prospects**. p. 85-100, 2011.

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

BRAGA, V.S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça.** 2006. 90p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BRASSER, H. J.; KRIJGER, G. C.; WOLTERBEEK, H. T. On the beneficial role of silicon to organisms: A case study on the importance of silicon chemistry to metal accumulation in yeast. **Biological Trace Element Research**, v. 125, p. 81-95, 2008.

CASTRO, H.F. Indústria alcooleira. **Processos Químicos industriais II.** v. 2. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO (COPERSUCAR). Centro de Tecnologia. Divisão industrial. **Fermentação.** São Paulo, p. 434, 1987.

CRUZ, M. L. Estudo de fatores que interferem na produtividade da fermentação alcoólica em batelada alimentada. **Jornal de Engenharia, Tecnologia e Meio Ambiente.** v. 1, n. 1, p. 7-10, 2016.

CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.** 119 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2019.

DECAUX, C. Activated silicon dioxide to achieve a synergistic effect in pigs. **International Pig Topics.** v. 32, n. 1, p. 25, 2017.

EITH, C.; KOLB, M; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. Práticas em cromatografia de íons: uma introdução. **Metrohm**, p. 142, 2006.

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

GUTERREZ, L. E.; DE MARTIN ORELLI, V. F. Efeito do nitrito sobre a fermentação alcolica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba**, v. 48, p. 41-54, 1991.

HU, C.K.; BAI, F. W.; AN, L. J. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg²⁺ via reduction in plasma membrane permeability. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1191-1194, 2003.

JOANNIS-CASSAN, C.; RIESS, J.; JOLIBERT, F.; TAILLANDIER, P. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. **Biomass and Bioenergy**. v. 70, p. 165-173, 2014.

KOSHIMIZU, L.H.; CRUZ, M.R.M.; GOMEZ, E.I.V.; NETTO, C.L.B.; GONÇALVES, A.C.R.; BORZANI, W. Avaliação da Concentração de Leveduras Suspensas em um Meio Aquoso pela Medida do Volume Ocupado pelas Células. **Saccharum**. São Paulo. v, 4 (18). p. 14-16, 1982.

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

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

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

MAGASANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **GENE**, v.290, n.1-2, p. 1–18, 2002.

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT- Tecnologia e Inovação**.v.1, n.4, p.58-73, 2017.

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

PIERCE, J.S. Analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**. v.76, n.5, p.442-443, 1970.

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

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Improvement of ethanol production in very high gravity (VHG) fermentation by horse gram (*Dolichos biflorus*) flour supplementation. **Letter Applied Microbiology**, v. 41, p. 440 – 444, 2005.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Role of finger millet (*Eleusine coracana L.*) flour. **Process Biochemistry**.v. 41, n. 3, p. 726 – 729, 2006.

SRCHUWONG, S.; FUJIWARA, M.; WANG, X.; SEYAMA, T.; SHIROMA, R.; ARAKANE, M.; MUKOJIMA, N.; TOKUYASU, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of high very gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 890-898, 2009.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effects of particulare materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environment Microbiology**, v. 60, p. 1519-1524, 1994.

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

TONOLI, F.C. **Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico**. 78 p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2018/2019**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em 15 de abril de 2020.

VAN UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. **Annual Reports of Fermentation Processes**, v. 8, p. 11-58, 1985.

VITOR, T. M. S. **Fermentações em Mostos com Altos Teores de Açúcar**. Tese Doutorado, Centro de Energia Nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

WANG, F. Q.; GAO, C. J.; YANG, C. Y.; XU, P. Optimization of an ethanol production medium in very high fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 233-236, 2007.

WEINZIERL, D.; LIND, A.; KUNZ, W. Hollow SiO₂ Microspheres Produced by Coating Yeast Cells. **Crystal Growth & Design**, v. 9, p. 2318-2323, 2009.

ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. Piracicaba, p. 134, 1996.

ZHANG, Q.; JIN, Y.; FANG, Y.; ZHAO, H. Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high-gravity bioethanol fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 41, p. 88-94, 2019.

ZHAO, X.Q.; BAI, F.W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 144, p. 2,2009.

4.2 ARTIGO 2 - EFEITO PROTETOR DA SÍLICA ATIVADA NA ADAPTAÇÃO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ETHANOL RED® EM FERMENTAÇÕES COM ALTOS TEORES ALCOÓLICOS

RESUMO

A fermentação com alto teor alcoólico (“*Very High Gravity VHG*”) é uma tecnologia que pode proporcionar redução de custos e aumento na produção de etanol (biocombustível) podendo contribuir com as metas do RenovaBio. O RenovaBio é um programa de política pública do Brasil para ampliar a participação dos biocombustíveis na matriz energética brasileira, visando contribuir com a mitigação das emissões de gases de efeito estufa (GEE). A VHG tem como característica importante a tolerância da levedura às altas concentrações de etanol durante a fermentação. Essa tecnologia pode reduzir até pela metade o volume de vinhaça produzida, além disso, apresenta inúmeras vantagens técnicas, econômicas e ambientais. O objetivo do trabalho foi verificar o potencial de efeito protetor da sílica sobre as leveduras em fermentações com alto teor alcoólico, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Ethanol Red®. Para tal, foi conduzido um experimento com três tratamentos: T1- Mosto controle sem suplementação de sílica⁽⁺⁾; T2- Mosto com suplementação de sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e T3- Mosto com suplementação de sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹. O mosto esterilizado foi obtido a partir de xarope, com concentração inicial de 261,2 g L⁻¹ de ART. As fermentações foram realizadas em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de mosto e inoculados com 3% (massa seca) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Ethanol Red®. Para a condução da fermentação, os Erlenmeyers, contendo os mostos e as leveduras, foram incubados em *shaker*, sob agitação de 120 rpm, em temperatura de 30°C. Ao todo foram realizados 5 ciclos fermentativos, onde os mostos apresentaram as seguintes concentrações de ART (182,2; 199,5; 221,2; 241,1; e 261,2 g L⁻¹). Ao longo dos 5 ciclos fermentativos, as fermentações submetidas ao tratamento com sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ se destacaram dos demais tratamentos apresentando viabilidade celular entre 77,5 a 81,5%, produção de biomassa entre 8,1 a 10,0 g L⁻¹, rendimento entre 90,0 a 95,3 % e produtividade fermentativa entre 7,3 a 10,9 mL L⁻¹ h⁻¹. Em conclusão, a sílica⁽⁺⁾ (100 e 300 mg L⁻¹) apresenta efeito protetor sobre a levedura, permitindo ter reflexos positivos na fermentação. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Ethanol Red®, apresenta habilidade de realizar fermentações sob condições de alto teor alcoólico.

Palavras-chave: Etanol; levedura; reciclo celular; suplementação.

ABSTRACT

Protective effect of silica in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® in Very High Gravity fermentation

The Very High Gravity fermentation (VHG) is a technology that can reduce costs and increase ethanol production (biofuel) and can contribute to RenovaBio's goals. RenovaBio is a public policy program in Brazil to expand the participation of biofuels in the Brazilian energy matrix, aiming to contribute to the mitigation of greenhouse gas (GHG) emissions. The important characteristic of VHG is the tolerance of yeast to high concentrations of ethanol. This technology can reduce by half the volume of vinasse produced, in addition, it has numerous technical, economic and environmental advantages. The purpose of this work was to verify the

potential protective effect of silica on yeasts in fermentations with high alcohol content, using *Saccharomyces cerevisiae*, strain Ethanol Red[®]. In summary three treatments were performed in this experiment: T1- Control wort without silica⁽⁺⁾ supplementation; T2- Wort with silica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ supplementation and T3- Wort with silica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ supplementation. The sterilized wort used obtained from the syrup, with an initial concentration of 182.2 g L⁻¹ of ART. Fermentation was carried out in Erlenmeyer's of 500 mL, containing 200 mL of sterile wort and inoculated 3% (dry mass) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain Ethanol Red[®]. To conduct the fermentation, the Erlenmeyers were incubated in *shaker*, under agitation of 120 rpm, at a temperature of 30°C. 5 fermentative cycles were carried out, with the following wort concentration (182.2; 182.2; 199.5; 221.2; 241.1; and 261.2 g L⁻¹). Over the 5 fermentative cycles, the fermentations submitted to the treatment with silica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ stood out from the other treatments presenting cell viability between 77,5 to 81,5%, biomass production between 8.1 to 10.0 g L⁻¹, yield between 90.0 to 95.3% and fermentative productivity between 7.3 to 10.9 mL L⁻¹ h⁻¹. In conclusion, silica⁽⁺⁾ (100 and 300 mg L⁻¹) has a protective effect on yeast, allowing positive reflections in fermentation. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, strain Ethanol Red[®], has the ability to carry out fermentations under conditions of high alcohol content.

Keywords: Ethanol; yeast strain; cell recycling; supplementation.

INTRODUÇÃO

No Brasil, em dezembro de 2017, foi aprovado o RenovaBio, que é um Decreto Lei que define diretrizes para a Política brasileira de biocombustíveis, instituída pela Lei n° 13.576/2017. O programa tem como objetivo estabelecer metas anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, de forma a incentivar o aumento e produção de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país (ANP, 2020).

A fermentação com alto teor alcoólico (“*Very High Gravity - VHG*”) é uma tecnologia que pode contribuir com esta política nacional por meio de alternativas para aperfeiçoar o processo de produção do etanol nas usinas. A VHG tem como característica importante a tolerância da levedura às altas concentrações de etanol. Essa tecnologia utiliza mostos com concentrações de açúcares redutores totais maiores do que 25 %, com a finalidade de obter vinhos com teores alcoólicos maiores que 15% e reduzir até pela metade o volume de vinhaça produzida (NUANPENG et al., 2011; SRIDEE et al., 2011).

A vinhaça é um resíduo utilizado nas áreas agrícolas das usinas, que pode apresentar alto poder poluidor, uma vez que, as suas características físico-químicas lhe permitem ser utilizada como fertilizante (CORTEZ, 2014). É possível também destacar outras vantagens da fermentação com alto teor alcoólico como a economia com o transporte da vinhaça até as áreas

de fertirrigação, economia de energia (vapor) que pode ser empregada para cogeração de energia elétrica, economia de insumos (ácido sulfúrico e antibacterianos), economia de água circulando no processo e redução do número de centrífugas (AMORIN, et al., 2010).

Estudos tem mostrado que o ponto chave para o sucesso da fermentação com alto teor alcoólico está ligado com a capacidade da levedura em se adaptar às condições de estresse (altas concentrações de açúcar, mudanças de temperatura, risco de contaminação e altas concentrações de etanol). Desta maneira, é possível desenvolver novas abordagens para construir cepas robustas com melhor tolerância ao estresse e melhorar desempenho da fermentação alcoólica (BAI et al., 2004;BAI et al., 2008). A sílica surge como uma alternativa, uma vez que, estudos mostraram que compostos a base de silício estimularam o crescimento celular de alguns microrganismos em condições estressantes. (UMAMAHESWARI, et al., 2016).

A sílica é um composto com mais de 98% de dióxido de silício (SiO_2) e quando submetida a um tratamento eletromagnético torna-se ativada (sílica⁽⁺⁾). Devido a composição e organização tetraédrica das moléculas de dióxido de silício, a sílica⁽⁺⁾ tem a capacidade de armazenar grande quantidade de informações em sua superfície (DECAUX, 2017). Por isso, em condições estressantes é utilizada para auxiliar na absorção de amônia e CO_2 de microrganismos. (UMAMAHESWARI, et al., 2016).

O objetivo do trabalho foi verificar o efeito da sílica ativada na fermentação com alto teor alcoólico, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Ethanol Red[®], para aumentar a tolerância dessas leveduras ao estresse alcoólico.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização da pesquisa

O estudo foi executado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ/USP.

Substrato

O xarope de cana-de-açúcar foi utilizado como matéria-prima para a obtenção do mosto. Esse produto foi obtido de usina na região de Piracicaba/SP. Inicialmente, em um galão de 5 L

o xarope foi diluído em água destilada até atingir a concentração de açúcar redutor total (ART) de $261,2 \text{ g L}^{-1}$ e o volume de 4 L. O xarope diluído foi clarificado através da adição de $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Em seguida, em autoclave o material foi aquecido até $121 \text{ }^\circ\text{C}$, sob 1 atm e mantido sob estas condições por 15 minutos.

O xarope diluído foi resfriado e mantido em repouso por 48 horas, para decantar os colóides em suspensão. Após o repouso, o sobrenadante do xarope diluído foi sifonado e acondicionado em um galão de vidro de 5 L. A concentração de açúcares redutores totais (ART) foi ajustada, com adição de água destilada, até $261,2 \text{ ART g L}^{-1}$. Para preparar os mostos de cada ciclo fermentativo, o xarope foi suplementado com 100 mg L^{-1} de uréia e posteriormente diluído com água destilada até atingir a concentração de açúcar desejada ($182,2$; $199,5$; $221,2$ e $241,1 \text{ ART g L}^{-1}$). Em seguida, os mostos foram esterilizados em autoclave sob temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 20 minutos e sob 1 atm (BRAGA, 2006).

Tratamentos

Os tratamentos avaliados consistiram em considerar o aumento da concentração de açúcares nos substratos, em ciclos fermentativos sucessivos, utilizado o reciclo celular e a adição de sílica ativada aos mostos com diferentes concentrações de ART. Os tratamentos e ciclos fermentativos realizados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos realizados quanto a concentração de açúcar, concentração de uréia suplementada e tratamentos aplicados durante os 5 ciclos fermentativos no experimento.

Tratamentos	Ciclo fermentativo	Açúcar (g L ⁻¹)	Uréia (mg L ⁻¹)
Controle (T1)	1° Ciclo	182,2	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	2° Ciclo	199,5	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	3° Ciclo	221,2	100
Sílica 100 ⁽⁺⁾ mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica 300 ⁽⁺⁾ mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	4° Ciclo	241,2	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			
Controle (T1)	5° Ciclo	261,2	100
Sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L ⁻¹ (T2)			
Sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L ⁻¹ (T3)			

Condução dos ensaios de fermentação

Para a condução da fermentação foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL como biorreatores. Nestes biorreatores foram adicionados 200 mL de mostos previamente preparados, conforme descrito na Tabela 2, e inoculados com a adição de 6 gramas de leveduras, de *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Ethanol Red[®] (Lesaffre). As fermentações foram

conduzidas em *shaker*, modelo *Minitron*, marca Infors HT[®], sob agitação de 120 rpm e temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. O monitoriamento da condução da fermentação foi realizado em intervalos de 60 minutos, através da avaliação da massa de CO₂ desprendida nesse intervalo. A determinação do desprendimento de CO₂ foi realizada utilizando uma balança semi-analítica (0,001g), Modelo BL 3200HL, marca Shimadzu. O término das fermentações foi definido como sendo o momento da fermentação no qual a variação da massa de CO₂ desprendida era menor do que 0,5 g em 2 horas de processo.

Logo após o término da fermentação, o vinho bruto foi centrifugado, sob 3925 g, por 10 minutos, utilizando uma centrífuga refrigerada modelo Sorvall ST 40R, Marca Thermo Scientific[®], para separar as leveduras do vinho. Após a centrifugação, os sobrenadantes (vinho de levedurado) foram transferidos para frascos plásticos de 200 mL, previamente identificado e armazenados em freezer, sob temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$, para posteriormente ser caracterizados através das análises físico-químicas. Por outro lado, o material sedimentado (as leveduras) foi utilizado em outro ciclo fermentativo por 4 ciclos fermentativos, conforme metodologia descrita por (COPERSUCAR (1987)).

Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi determinada através da coloração diferencial das células em solução de azul de metileno 0,1%. Essa análise consistiu em retirar uma alíquota de 1 mL de mosto/vinho com leveduras, diluir 20 vezes, homogeneizar com o mesmo volume da solução de azul de metileno. Em seguida, foram adicionados 100 µL dessa suspensão de células-corante em uma câmara de Neubauer e após cobri-la com a lamínula, essa foi observada com o auxílio de microscópio óptico, Modelo E 200, marca Nikon[®]. Segundo a metodologia descrita por Pierce (1970) as células incolores foram consideradas vivas e as células coradas com o azul de metileno, por não conseguirem eliminar o corante foram consideradas mortas.

Biomassa celular

Para determinar a biomassa celular, foi medido após a fermentação do vinho presente no reator com o auxílio de uma proveta graduada de 500 mL. Em sequência, a amostra foi submetida à centrifugação sob 3925 g por 10 minutos. Após o fim dessa etapa, o volume do sobrenadante foi medido em uma proveta graduada de 500 mL e por diferença foi determinado o volume de creme de levedura. A partir desses dados do volume de creme de leveduras foi estimada a concentração de leveduras (gramas de matéria seca por litro de vinho) de acordo com a metodologia descrita por KOSHIMIZU et al (1982).

Determinação de açúcares totais e glicerol

As concentrações de glicose, frutose, sacarose e glicerol presentes no mosto e no vinho, durante os ciclos fermentativos, foram determinadas utilizando um cromatógrafo de íons, modelo IC 930, da marca Metrohm®. Para essas análises foi utilizado seguinte sistema cromatográfico: coluna cromatográfica, modelo Metrosep Carb 1 – 150/4.0; detector amperométrico; solução de eluente preparada foi o hidróxido de sódio 200 mM e o fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida em 35 °C (EITH et al.; 2006). As amostras foram diluídas e filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45µm. Para cada análise foram injetados 0,25 µL da amostra e o tempo de corrida de 9 minutos.

Determinação do Teor Alcoólico

Foram coletados 25 mL do vinho de levedurado de cada unidade experimental. Esse volume foi transferido para a célula de alimentação de um destilador para álcool, Modelo TE-010 (marca Tecnal) e destilado por arraste em vapor, recolhendo-se 25 mL do destilado, em balão volumétrico. As amostras dos destilados foram analisadas quanto ao teor alcoólico em um densímetro marca Schimidt Haensch, modelo EDM 5000 em temperatura de trabalho de 20 °C com desvio de 0,1°C (ZAGO et al., 1996).

Rendimento fermentativo

O cálculo do rendimento fermentativo foi realizado com base na estequiometria da fermentação alcoólica, em que o rendimento de 100% ocorre quando há formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100g de açúcares redutores totais. Assim, o rendimento fermentativo foi calculado de acordo com a Equação 4 (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT, 1990).

$$RF = \frac{g \text{ de etanol no vinho}}{g \text{ de ART no mosto} \times 0,5111} \times 100$$

(Eq. 4)

Produtividade de fermentação

A produtividade foi calculada com base na concentração alcoólica do vinho ao final da fermentação e no tempo de fermentação. A produtividade de fermentação (PF) foi calculada por meio da Equação 5 (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT, 1990).

$$PF = \frac{\text{Concentração de etanol no vinho (g L}^{-1}\text{)}}{\text{Tempo de fermentação (h)}}$$

(Eq. 5)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade celular

Ao longo dos 5 ciclos fermentativos as leveduras submetidas aos tratamentos controle (T1), Tratamento sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ (T2) e Tratamento sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ (T3) demonstraram, respectivamente, aumento nas viabilidades celulares médias de 9,5%, 9,2% e 15% (Figura 11). Isso indica que a linhagem da levedura Ethanol Red[®], apresentou capacidade

fisiológica para se adaptar às condições de cultivo, em batelada simples, com o aumento gradativo dos teores de açúcares no mosto de $182,2 \text{ g L}^{-1}$ até $261,2 \text{ g L}^{-1}$ durante 5 ciclos fermentativos. De fato, cada linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta capacidade genética específica para tolerar altas concentrações de etanol. Uma vez que, durante as condições de estresses as leveduras expressam diversos genes que codificam proteínas envolvidas em vários processos celulares (BENITEZ et al., 1983; ROSSIGNOL.; 2003).

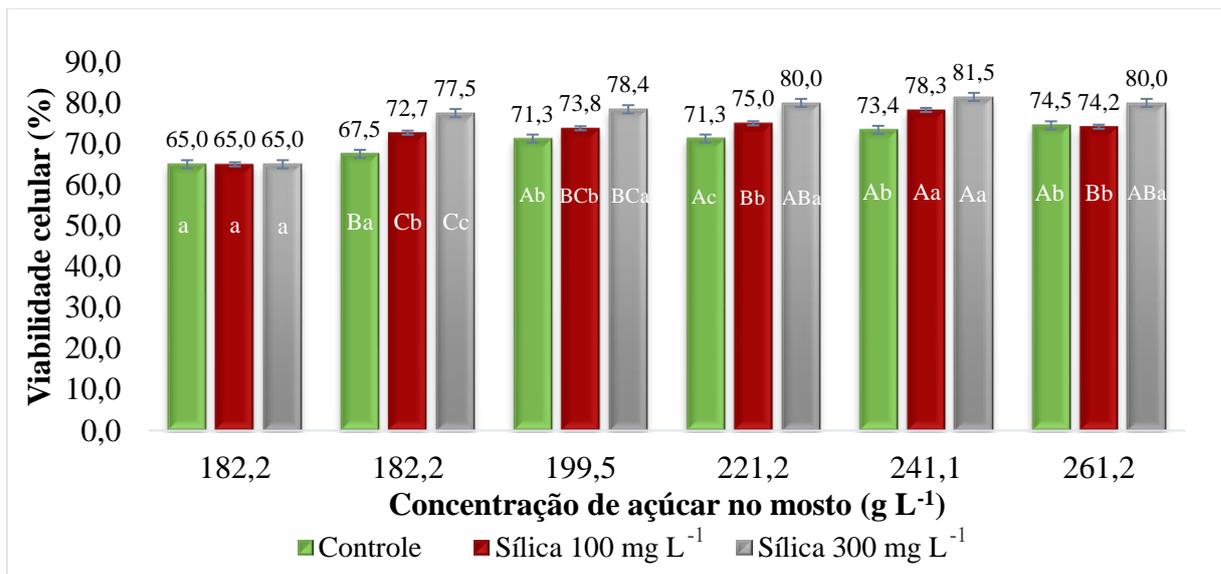


Figura 11. Viabilidade celular das leveduras Ethanol Red® submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L^{-1} e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L^{-1} ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Entretanto, analisando o efeito dos tratamentos empregados sobre as leveduras ao longo dos 5 ciclos fermentativos, através da análise da comparação das médias (teste estatístico ($p \leq 0,05$)), foi possível verificar o aumento médio da viabilidade celular das leveduras submetidas ao tratamento T3 foi maior do que aqueles das leveduras submetidas ao T1 e T2. As diferenças verificadas entre as células de leveduras que não receberam a sílica ativada e àquelas submetidas ao T3 talvez possam ser explicadas pelo fato de a sílica ⁽⁺⁾ ter sido adsorvida na parede celular das leveduras. De modo que, a sílica ⁽⁺⁾ pode ter atuado na regulação da homeostase das células, contribuindo para reduzir os efeitos causados pelas altas concentrações

de açúcares iniciais das fermentações e a altas concentrações de etanol no final das fermentações. Isto porque, segundo (SIDERIUS; MAGER, 2002), a exposição das células de leveduras à alta osmolaridade no meio, pode proporcionar nas células o decréscimo de água intracelular, levando à perda de turgor e, conseqüentemente, a redução do crescimento celular.

Uma possível explicação para a sílica ativada eletronicamente poder ter potencializado o aumento da viabilidade celular pode estar relacionada com a interação da mesma com a levedura. Uma vez que, a parede celular da levedura é composta por uma camada dupla de polissacarídeos, formados particularmente β -glucanos alcalinos insolúveis, β -glucanos alcalinos solúveis, manoproteínas e quitina. No entanto, a composição da parede celular está sujeita a variações consideráveis de acordo com as condições de crescimento. (FELDMANN, 2012). As diferentes polaridades e a natureza hidrofílica ou hidrofóbica dos polímeros dessa parede definem a capacidade da levedura de reter ou adsorver diferentes moléculas. (MORATA 2003). Sabe-se que as células de levedura se ligam a diferentes moléculas, como micotoxinas e íons metálicos, através de estruturas de ligação complexas na superfície da parede celular (SHETTY; JESPERSEN, 2006). BRASSER, et al (2008) reportaram que os materiais de silicato podem ser adsorvidos na superfície da célula e interagir com íons, de modo que, pode alterar a afinidade da célula por esses íons alterando significativamente o crescimento e a viabilidade celular de microrganismos. Comportamento semelhante das células de leveduras também foi observado por WEINZIERL, et al 2009, quando utilizando o composto tetraetil ortossilicato no substrato verificaram que aderiram na superfície da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

No entanto, as viabilidades celulares encontradas nos tratamentos ao longo dos 5 ciclos no presente trabalho são similares a alguns trabalhos. Uma vez que, ZHAO et al. (2009) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem SPSC01 em fermentação com a concentração de glicose no mosto de 245 g L⁻¹ e suplementação de zinco (0,01, 0,05 e 0,1 g L⁻¹) obtiveram viabilidade celular de 50,9-72,5%. Enquanto, LI et al. (2009) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 em mostos com concentração de açúcar de 250-320 g L⁻¹ verificaram viabilidade celular de 78-97%.

Biomassa celular

Inicialmente para realizar a primeira fermentação (1º ciclo) todos os tratamentos (T1, T2 e T3) partiram da mesma concentração de biomassa celular de 6 g. Sendo que, no final dos 5 ciclos fermentativos as biomassas celulares das leveduras submetidas aos tratamentos controle, tratamento sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e o tratamento sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ aumentaram, respectivamente, em média de 3,4 g L⁻¹, 4,0g L⁻¹ e 4,0g L⁻¹ (Figura 12). No entanto, os tratamentos T1, T2 e T3 apresentaram aumento médio da biomassa celular de um ciclo fermentativo para o outro de, respectivamente, 9,4%,11,0% e 11,3%. Isso indica que a concentração de etanol no meio não impediu as células da levedura de se multiplicarem, ou seja, realizando a adaptação da levedura em altos teores alcoólicos foi possível minimizar os efeitos do etanol sobre a multiplicação da levedura Ethanol Red. Os resultados encontrados neste trabalho são similares aos encontrados por BASSO, et al (2011), onde, de acordo com os autores é estimado que durante um ciclo de fermentação a biomassa da levedura aumente de 5 a 10% em relação a sua biomassa inicial.

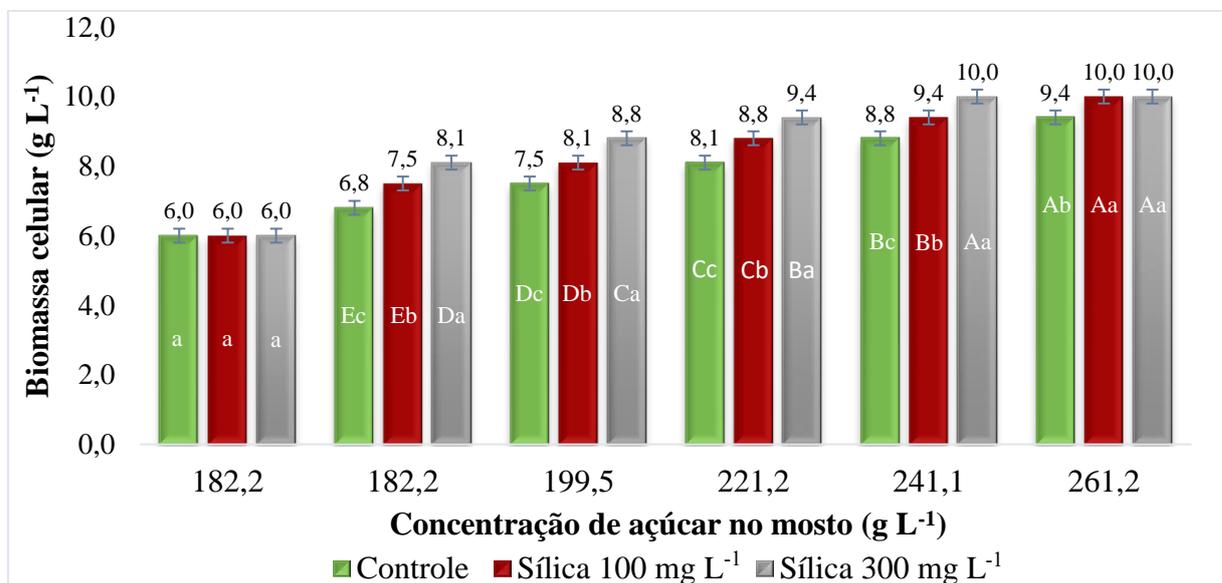


Figura 12. Biomassa celular das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Entretanto, analisando o efeito dos tratamentos empregados sobre as leveduras ao longo dos 5 ciclos fermentativos, através da análise da comparação das médias (teste estatístico ($p \leq 0,05$)), foi possível verificar o aumento médio da biomassa celular das leveduras submetidas ao tratamento T3 foi maior do que aqueles das leveduras submetidas ao T1 e T2. Isso mostra que a adição de sílica ⁽⁺⁾ no meio fermentativo auxilia na proteção da célula da levedura, de modo, a aumentar a biomassa celular durante a fermentação com alto teor alcoólico. De fato, na fermentação com alto teor alcoólico a levedura requer fontes nitrogenadas disponíveis no meio, sendo que, a adição de materiais particulados e nutrientes aumentam a eficiência da multiplicação celular (THOMAS et al., 1990; LEKKAS et al., 2007). Dessa forma, efeitos semelhantes foram observados no crescimento outros microrganismos em condições adversas como verificados por UMAMAHESWARI, et al. (2016), no qual, mostraram que ácido silícico e outros compostos contendo silício promovem o crescimento bacteriano sob condições oligotróficas, visto que, compostos de silício podem absorver amônia e CO₂ da atmosfera, permitindo assim que as bactérias fixem o CO₂, utilizando energia obtida a partir da oxidação do amônio. Apesar de, não se ter muitas informações do mecanismo de atuação da sílica sobre as células da levedura, é possível inferir que essa interação pode possibilitar a melhor assimilação de uréia pela levedura e também auxiliar na liberação de CO₂ para o meio. Uma vez que, materiais de silício podem ser adsorvidos na superfície da célula e interagir com íons, de modo que, pode alterar a afinidade da célula por esses íons alterando significativamente o crescimento celular (BRASSER et al., 2008).

Açúcares redutores totais

Inicialmente todos os tratamentos começaram as fermentações com a mesma concentração de açúcar. As concentrações iniciais de açúcar presente nos mostos em cada ciclo foram: 1º ciclo 182,2 g L⁻¹; 2º ciclo 199, 5 g L⁻¹; 3º ciclo 211,2 g L⁻¹; 4º ciclo 241,1 g L⁻¹ e 5º ciclo 261,2 g L⁻¹ de ART. Após o fim de cada ciclo fermentativo, foi possível verificar que em todos os tratamentos todo o açúcar disponível do meio foi consumido e convertido em produto (Figura 13). Isso indica que fermentação foi realizada até o final sendo o açúcar convertido em etanol, glicerol e CO₂. Os valores obtidos neste trabalho vão ao encontro com o que alguns autores da literatura observaram em seus respectivos trabalhos. Sendo que, FURLAN (2012), realizou fermentações com reciclo celular utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e uma biodiversidade de linhagens coletadas de destilarias)

em meio contendo concentração de 15 a 25% de ART inicial. Nesse estudo foi verificado que o consumo de todo o açúcar pelas leveduras que se adaptaram as condições estressantes. BARBOSA (2013) realizou fermentações utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2, CAT-1 e Ethanol Red[®]) em meio contendo concentração 30% de sacarose e verificou o consumo de todo o açúcar pelas leveduras.

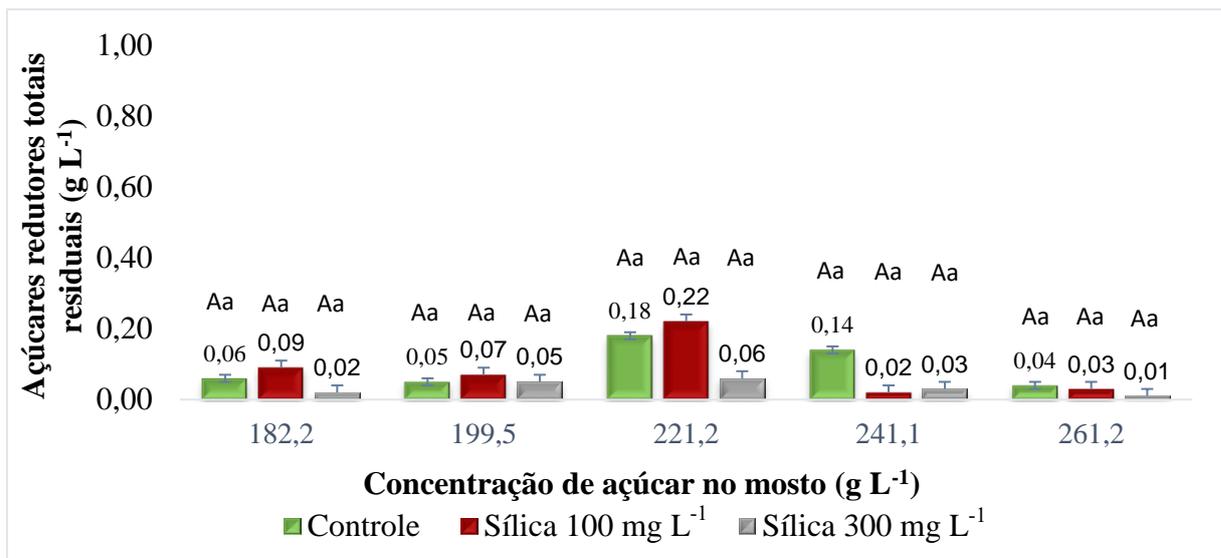


Figura 13. Açúcares redutores totais residuais presente no vinho das fermentações submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Glicerol

Analisando as concentrações de glicerol presente nos vinhos após os ciclos fermentativos (Figura 14), foi possível observar pelos resultados obtidos no experimento em que as leveduras submetidas aos tratamentos controle, sílica ⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica ⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹, apresentaram aumento na produção de glicerol a partir do terceiro ciclo fermentativo. Contudo, esse aumento observado foi minimizado conforme as concentrações de açúcar no substrato foram elevadas. Isso mostra que a linhagem da levedura é capaz de tolerar os estresses proporcionados pela alta concentração de açúcar e etanol no meio. De fato, a capacidade de crescimento e fermentação em diferentes concentrações de etanol e açúcar variaram de uma

linhagem para outra (BENITEZ et al.,1983). Sendo que, uma forma da linhagem de levedura se adaptar as essas condições estressantes do meio é aumentar a produção de glicerol (ERASMUS et al., 2003; GUO et al., 2011).

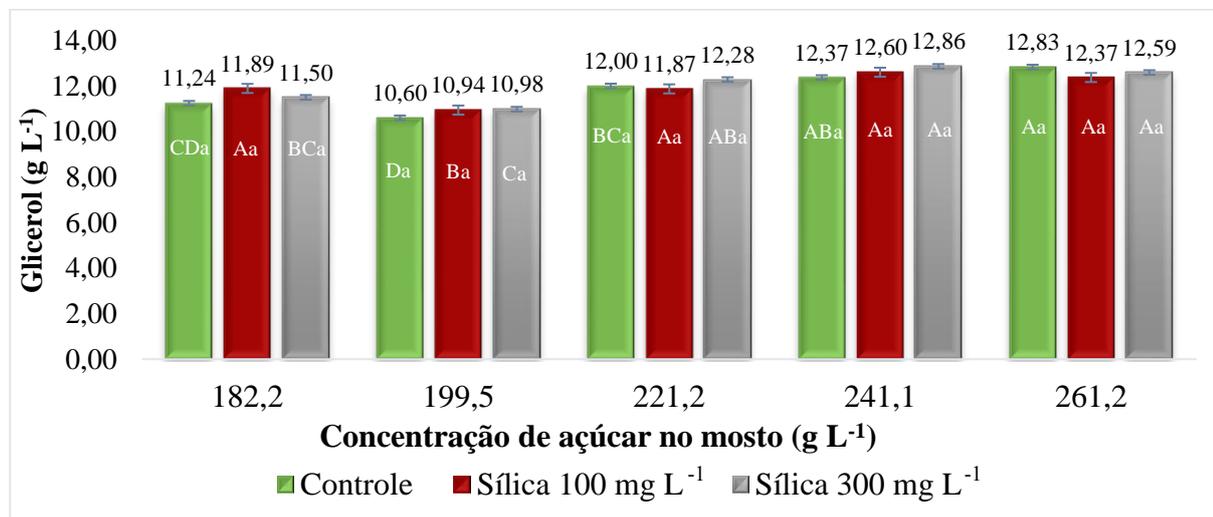


Figura 14. Glicerol produzido pelas leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

De acordo com BASSO et al (2011) em fermentações alcoólicas é estimado que 5-8% do açúcar metabolizado pela levedura seja convertido em glicerol. Sendo assim, partindo do consumo total dos açúcares durante o processo fermentativo, os mostos dos ciclos (1^o ao 5^o) com 182,2; 199,5; 221,2; 241,1 e 261,2 g L⁻¹ de ART teriam, respectivamente, a produção de glicerol estimada na faixa de 9,1 a 14,6 g L⁻¹; 10,0 a 16,0 g L⁻¹; 11,1 a 17,7 g L⁻¹; 12 a 19,3g L⁻¹; 13,1 a 20,9 g L⁻¹. Deste modo é possível observar que os valores do 1^o ao 4^o ciclo de todos os tratamentos estão na faixa descrita por BASSO et al (2011). Já no 5^o ciclo os resultados de glicerol obtido em todos os tratamentos foram abaixo do esperado pela literatura. Uma hipótese para tal situação, é a levedura ter sido adaptada gradualmente ao acréscimo de açúcar no mosto e conseqüentemente a levedura não necessitou de aumentar a produção de glicerol para se adaptar ao meio com alto teor alcoólico. Uma vez que, a exposição ao estresse osmótico faz com que a levedura aumente a produção de glicerol de modo a minimizar este efeito tóxico a célula (ATTFIELD, 1997).

Investigando os efeitos dos tratamentos sobre as leveduras ao longo de cada ciclo fermentativo foi possível verificar que, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos quanto a formação de glicerol. No entanto, esse resultado não era esperado pelo presente trabalho, uma vez que, a sílica⁽⁺⁾ proporcionou aumento na viabilidade e biomassa celular. Assim como, alguns autores observaram que adição de materiais particulados aos meios de fermentação reduziram a produção de glicerol pela levedura (REDDY; REDDY, 2005).

Teor alcoólico

Os teores alcoólicos presentes nos vinhos após o fim de cada ciclo fermentativo podem ser observados na Figura 15. Analisando o teor alcoólico produzido pelas leveduras submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo dos 5 ciclos fermentativos, foi possível observar que o teor alcoólico produzido pelas leveduras aumentou, à medida que, a concentração de açúcar no mosto foi elevada. O teor alcoólico encontrado nos vinhos do 1º ao 5º ciclo dos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ aumentaram, respectivamente, em 6,0%, 4,9% e 5,2%. De fato, alguns autores utilizando linhagens diferentes de leveduras observaram o aumento do teor alcoólico na adaptação da levedura as altas concentrações de açúcar (VITOR, 2014; TONOLI, 2017).

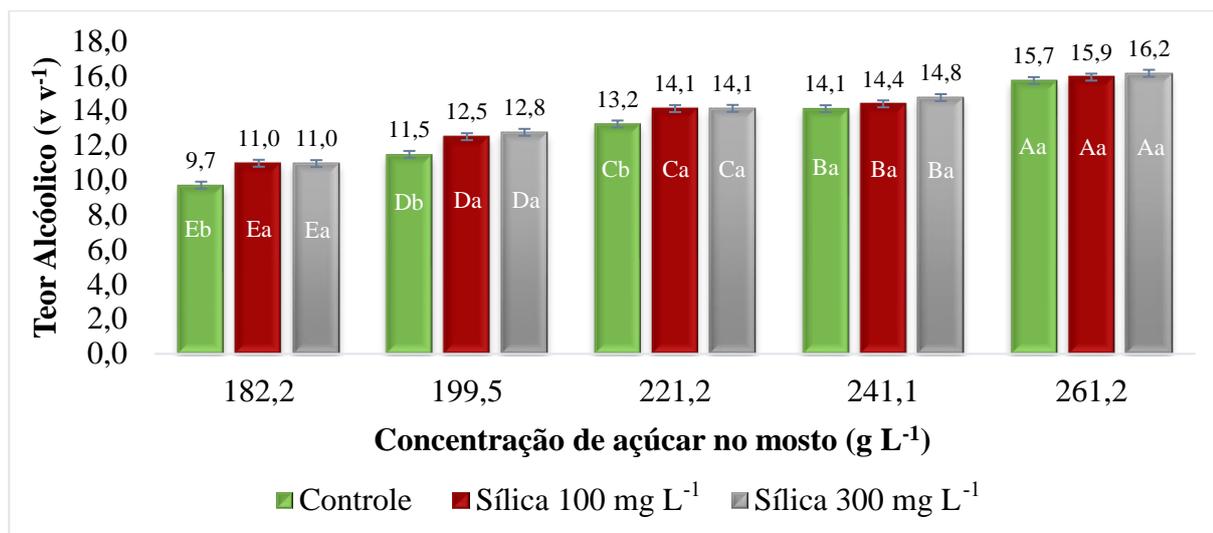


Figura 15. Teor alcoólico produzido pelas leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

No entanto, os resultados (15,7-16,2% v v⁻¹) obtidos no presente trabalho demonstraram teores alcoólicos maiores do que os descritos na literatura, uma vez que, VITOR (2014) adaptou a levedura PE-2 em condições crescentes de açúcar (95-241 g L⁻¹) e obteve após a adaptação 12 % v v⁻¹ de teor alcoólico. Enquanto, TONOLI (2017) adaptou as linhagens MYCOFERM C22 e Y904 em concentrações de açúcar de 50-280 g L⁻¹ e alcançou teores de 13-14% v v⁻¹ de etanol. Contudo, essa diferença encontrada pode ser explicada devido a utilização de linhagens diferentes de leveduras.

Por outro lado, CRUZ (2019) realizou fermentações utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®] em meio contendo concentração de 300 g L⁻¹ de sacarose e temperatura de 30°C e obteve teor alcoólico médio de 16% (v v⁻¹). Em concentrações mais baixas de açúcar (261,2 g L⁻¹) o presente trabalho encontrou valores similares, isso pode indicar que a levedura empregada nas condições do presente trabalho apresentou maior habilidade em converter açúcar em etanol. Uma hipótese, para tal, é o fato de a levedura ter sido adaptada gradualmente ao aumento da concentração de etanol no meio.

Investigando os efeitos dos tratamentos sobre a levedura ao longo de cada ciclo fermentativo foi possível observar que, após o final do 1º ciclo os vinhos provenientes das

fermentações (182,2 g L⁻¹ de ART) submetidas aos tratamentos T2 e T3 promoveram, respectivamente, aumento no teor alcoólico de 1,3% em relação ao T1. No entanto, nos demais ciclos fermentativos não houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. Dessa maneira, é possível verificar que adição da sílica⁽⁺⁾ no mosto não apresenta efeito negativo sobre a levedura em relação a produção de etanol.

Rendimento fermentativo

Analisando os rendimentos fermentativos obtidos ao longo dos 5 ciclos fermentativos é possível verificar que, os ensaios empregando o tratamento controle apresentaram rendimento fermentativo entre 82,3 a 89,1%. Enquanto os ensaios empregando o tratamento sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ apresentaram rendimento fermentativo entre 88,1 a 94,9%. Entretanto, os ensaios empregando o tratamento sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ apresentaram rendimento fermentativo entre 90,0 a 95,3% (Figura 16).

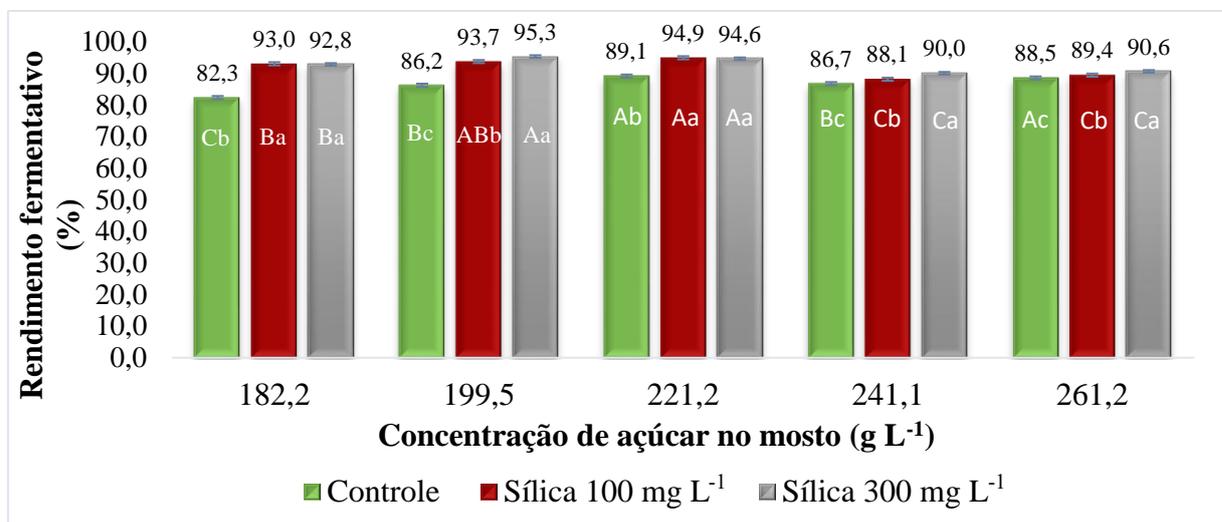


Figura 16. Rendimento fermentativo das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentre as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentre os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Contudo, comparando os resultados obtidos com a literatura, todos os tratamentos apresentaram rendimentos fermentativos similares aos encontrados na literatura, uma vez que, KAWA-RYGIELSKA; PIETRZAK (2014) inocularam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red em mostos contendo de 360 g L⁻¹ de ART e suplementação de 30 g L⁻¹ de extrato de levedura e obtiveram rendimentos fermentativos entre 68 a 88%.

Assim como, CERQUEIRA (2013) realizou fermentação com alto teor alcoólico com 6 ciclos utilizando as leveduras PE-2 e CAT-1. Após o 6º ciclo foi obtido no mosto de 25º Brix rendimento de 88,1% para a PE-2 e 94,7% para CAT-1. Enquanto, no mosto de 30º Brix foi alcançado rendimento de 96,0% para a PE-2 e 79,7% para CAT-1.

Resultados semelhantes também foram encontrados por JOANNIS-CASSAN et al. (2014) no qual, empregaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* C-10 em substrato contendo 300 g L⁻¹ de ART e atingiram rendimentos fermentativos entre 76-88%. De mesmo modo que, CRUZ (2019) obteve rendimento de 89,4-93,3% em fermentação com mosto de 300 g L⁻¹ de ART utilizando a levedura Ethanol Red[®].

Investigando os efeitos dos tratamentos sobre as leveduras em cada ciclo fermentativo foi possível verificar que, os tratamentos com sílica⁽⁺⁾ (T2 e principalmente T3) apresentaram maior rendimento fermentativo em relação ao controle em todos os ciclos. Isso pode ser explicado por a sílica atuar no aumento da viabilidade e biomassa celular minimizando assim o estresse osmótico sobre a levedura. O que resultou em aumento no rendimento fermentativo principalmente nos 1º, 2º e 3º ciclos.

Produtividade de fermentação

Na Figura 17, é possível verificar as produtividades fermentativas encontradas nas fermentações realizadas sob às condições de tratamentos avaliados em todos os 5 ciclos fermentativos. As produtividades fermentativas nos ensaios do tratamento controle variaram entre 6,5 a 9,5 mL L⁻¹ h⁻¹. Enquanto, as produtividades fermentativas nos ensaios do tratamento sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ variaram entre 7,3 a 10,9 mL L⁻¹ h⁻¹. Assim como, as produtividades das fermentações nos ensaios do tratamento Sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ variaram entre 7,3 a 10,9 mL L⁻¹ h⁻¹.

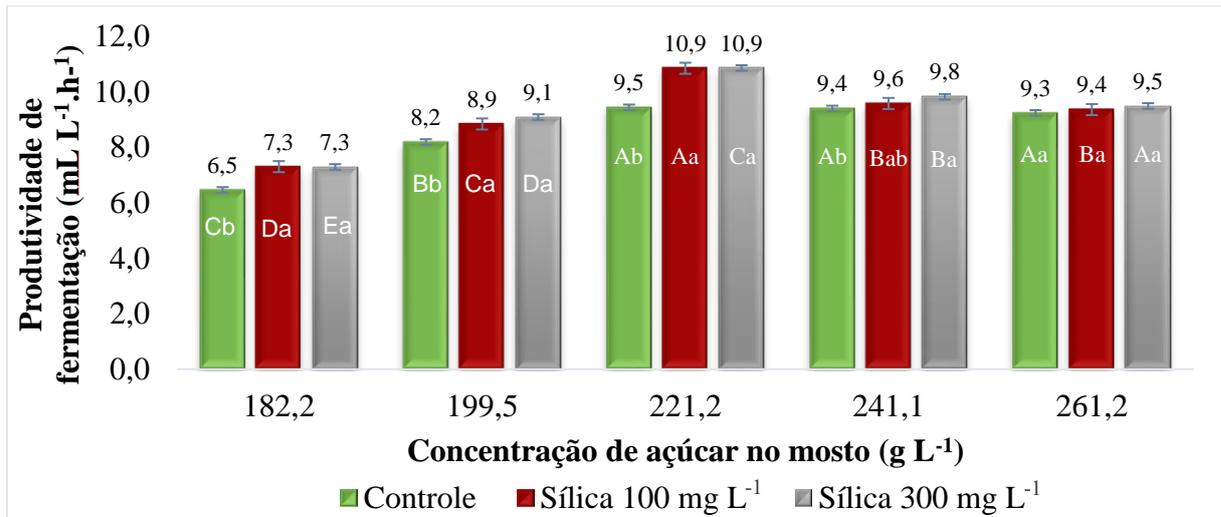


Figura 17. Produtividade de fermentação das leveduras Ethanol Red[®] submetidas aos tratamentos controle, sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹ e sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ ao longo de 5 ciclos fermentativos com diferentes concentrações de açúcar. Letras maiúsculas iguais não diferem entre si dentro as concentrações de açúcar de mesmo tratamento e letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro os tratamentos de mesma concentração de açúcar pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

LI et al. (2009) obtiveram em mostos com concentração de açúcar de 250-320 g L⁻¹ produtividades fermentativas em torno de 6,87-11,35 mL L⁻¹. h⁻¹ durante 9 ciclos de fermentação. Enquanto, FERRARI (2013) alcançou produtividades fermentativas de 6,6-7,7 mL L⁻¹ h⁻¹ em mosto com concentração de açúcar de 207-224 g L⁻¹. Os resultados obtidos neste presente trabalho quando comparado com outros ensaios fermentativos realizados na literatura, apresentaram em todos os tratamentos ao longo dos 5 ciclos produtividades fermentativas similares aos encontrados na literatura.

Por outro lado, ZHANG et al. (2019) empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-1 em mosto de 300 g L⁻¹ de ART alcançou produtividade fermentativa de 4,21 mL L⁻¹ h⁻¹. Enquanto, CRUZ (2019), utilizando levedura Ethanol Red[®] em mosto de 300 g L⁻¹ de açúcar atingiu produtividade fermentativa média de 3,2 mL L⁻¹ h⁻¹. Esses valores são abaixo do que os resultados encontrados no presente trabalho. Tal diferença pode ser explicada pela adaptação gradual da levedura aos altos teores alcoólicos, assim como devida a presença da sílica⁽⁺⁾ que minimizaram os efeitos estressantes presentes no meio sob a levedura.

Avaliando os efeitos dos tratamentos sobre a levedura ao longo de cada ciclo fermentativo foi possível observar que, o tratamento sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ apresentou a maior

produtividade ao longo dos 5 ciclos fermentativos, ressaltando assim a importância da sílica⁽⁺⁾ como um osmoprotetor na fermentação

CONCLUSÃO

Em conclusão, a sílica⁽⁺⁾ nas concentrações de 100 e 300 mg L⁻¹ apresentou efeito protetor aos efeitos tóxicos do alto teor alcoólico no meio para levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Ethanol Red[®], permitindo ter reflexos positivos na fermentação. Uma vez que, a presença da sílica⁽⁺⁾ (100 e 300 mg L⁻¹) aumentou a viabilidade celular; a produção de biomassa; o rendimento e a produtividade da fermentação.

A concentração da sílica⁽⁺⁾ adicionada ao mosto influenciou nos parâmetros fermentativos, sendo assim, ao longo dos 5 ciclos fermentativos, as leveduras submetidas ao tratamento com sílica⁽⁺⁾ 300 mg L⁻¹ apresentaram maior viabilidade celular, biomassa, rendimento e produtividade fermentativa quando comparado com os tratamentos controle e sílica⁽⁺⁾ 100 mg L⁻¹.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Produção e fornecimento de Biocombustíveis > RenovaBio**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/renovabio>>. Acesso em 19 de fevereiro de 2020.

AMORIM, H. V.; OLIVÉRIO, J. L.; BOSCARIOL, F. **Ecoferm**. Fermentação com até 16% de teor alcoólico: reduzindo a vinhaça pela metade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL E MOSTRA DE TECNOLOGIA E ENERGIA CANAVIEIRA - SIMTEC, 8., 2010.

ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1351-1357, 1997.

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

BAI, F. W.; CHEN, L. J.; ZHANG, Z.; 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**; v.110, p. 287–293, 2004.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. in: M.A. Dos Santos Bernardes (Ed.), **Biofuel production – recent developments and prospects**. p. 85-100, 2011.

BARBOSA, H. S. **Fermentação de mosto com alto teor de sacarose para a produção de bioetanol combustível por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usando alta densidade celular**. 2013. 92p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

BENÍTEZ, T.; CASTILLO, L.; AGUILERA, A.; CONDE, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n.5, p. 1429-1436, 1983.

BRAGA, V.S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para a produção de cachaça**. 2006. 90p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BRASSER, H. J.; KRIJGER, G. C.; WOLTERBEEK, H. T. On the beneficial role of silicon to organisms: A case study on the importance of silicon chemistry to metal accumulation in yeast. **Biological Trace Element Research**, v. 125, p. 81-95, 2008.

CERQUEIRA, D.P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. 2013. 66 p. Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO (COPERSUCAR). Centro de Tecnologia. Divisão industrial. **Fermentação**. São Paulo, p. 434, 1987.

CORTEZ, L. A. B. et al. **Sugarcane bioethanol - R&D for Productivity and Sustainability**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 2014.

CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. 119 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2019.

DECAUX, C. Activated silicon dioxide to achieve a synergistic effect in pigs. **International Pig Topics**.v. 32, n. 1, p. 25, 2017.

EITH, C.; KOLB, M; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. Práticas em cromatografia de íons: uma introdução. **Metrohm**, p. 142, 2006.

ERASMUS, D. J.; VAN DER MERWE, G. K.; VAN VUUREN, H. J. J. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 375-399, 2003.

FELDMANN, H. **Yeast: Molecular and Cell Biology**. 2ed. Weinheim: WILEY-BLACKWELL, cap. 2, p.5-24, 2012.

FERRARI, F. C.S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 57 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

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

GUO, Z.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 49-59, 2011.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT. **Manual de recomendações: Conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool**. São Paulo: Novo Tempo, p. 796, 1990.

JOANNIS-CASSAN, C.; RIESS, J.; JOLIBERT, F.; TAILLANDIER, P. Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. **Biomass and Bioenergy**. v. 70, p. 165-173, 2014.

KAWA-RYGIELSKA, J.; PIETRZAK, W. Ethanol fermentation of very high gravity (VHG) maize mashes by *Saccharomyces cerevisiae* with spent brewer`s yeast supplementation. **Biomass and Bioenergy**.v. 60, p. 50-57, 2014.

KOSHIMIZU, L.H.; CRUZ, M.R.M.; GOMEZ, E.I.V.; NETTO, C.L.B.; GONÇALVES, A.C.R.; BORZANI, W. Avaliação da Concentração de Leveduras Suspensas em um Meio Aquoso pela Medida do Volume Ocupado pelas Células. **Saccharum**. São Paulo. v, 4 (18). p. 14-16, 1982.

LEKKAS, C.; STEWART, G. G.; HILL, A. E.; TAIDI, B.; HODGSON, J. Elucidation of the role of nitrogenous wort components in the yeast fermentation. **Journal of the Institute of Brewing and Distilling**, v. 113, n.1, p. 3-8, 2007.

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

MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M. C.; SUBERVIOLA, J.; BARTOLOMÉ, B.; COLOMO, B.; SÚAREZ, J. A. Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 4084-4088, 2011.

NUANPENG, S.; LAOPAIBOON, L.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 14, n.1, p. 1-12, 2011.

PIERCE, J.S. Analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**. v.76, n.5, p.442-443, 1970.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Improvement of ethanol production in very high gravity (VHG) fermentation by horse gram (*Dolichos biflorus*) flour supplementation. **Letter Applied Microbiology**, v. 41, p. 440 – 444, 2005.

ROSSIGNOL, T.; DULAU, L.; JULIEN, A.; BLONDIN, B. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. **Yeast Functional Analysis Report**, v. 20, p. 1369-1385, 2003.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends Food Science Technology**. v. 17, p. 48-55, 2006.

SIDERIUS, M.; MAGER, W. H.; Conditional Response to Stress in Yeast. **Monatshefte fur Chemie Chemical Monthly**. v. 134, p. 1433-14445, 2003.

SRIDEE, W.; LAOPAIBOON, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. The use of dried spent yeast as a low-cost nitrogen supplement in ethanol fermentation from sweet sorghum juice under very high gravity conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 14, n.6, p. 1-15, 2011.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high gravity wheat mashes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.7, p. 2046-2050, 1990.

TONOLI, F.C. **Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico**. 78 p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

UMAMAHESWARI, T.; SRIMEENA, N.; VASANTHI, N.; CIBICHAKRAVARTHY, B.; ANTHONIRAJ, S.; KARTHIKEYAN, S. Silica as biologically transmuted source for bacterial growth similar to carbon; **Matters Archive**, p. 4–8, 2016.

VITOR, T. M. S. **Fermentações em Mostos com Altos Teores de Açúcar**. Tese Doutorado, Centro de Energia Nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

WEINZIERL, D.; LIND, A.; KUNZ, W. Hollow SiO₂ Microspheres Produced by Coating Yeast Cells. **Crystal Growth & Design**, v. 9, p. 2318-2323, 2009.

ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. Piracicaba, p. 134, 1996.

ZHANG, Q.; JIN, Y.; FANG, Y.; ZHAO, H. Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high-gravity bioethanol fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 41, p. 88-94, 2019.

ZHAO, X.Q.; XUE, C.; GE, X. M.; YUAN, W. J.; WANG, J. Y.; BAI, F. W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 139, p. 55-60, 2009.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904, não se adaptou às condições de fermentação com alto teor alcoólico, enquanto a *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red[®] se adaptou. Foi possível verificar que a sílica ativada, nas concentrações de 100 e 300 mg L⁻¹, exerceu efeito protetor sobre a levedura Ethanol Red[®], possibilitando a levedura obter durante os ciclos fermentativos alta viabilidade celular, aumento na concentração de biomassa, aumento da produção de etanol, aumento do rendimento e da produtividade fermentativa.