

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
DOUTORADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FERNANDO ANTÔNIO DA COSTA FIGUEIREDO VICENTE

SELEÇÃO, AVALIAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE UMA LEVEDURA PERSONALIZADA
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2015

SELEÇÃO, AVALIAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE UMA LEVEDURA PERSONALIZADA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Trabalho de Tese apresentado como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Alimentos do Programa de Pós – Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2015**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vicente, Fernando Antônio da Costa Figueiredo.

Seleção, avaliação e utilização de uma levedura personalizada para a produção de etanol / Fernando Antônio da Costa Figueiredo Vicente. -- São José do Rio Preto, 2015

112 f. : il.

Orientador: Roberto da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Levedos - Aplicações industriais. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Cariotipagem. 5. Fermentação. 6. Etanol – Indústria. I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

FERNANDO ANTÔNIO DA COSTA FIGUEIREDO VICENTE

**SELEÇÃO, AVALIAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE UMA LEVEDURA PERSONALIZADA
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Trabalho de Tese apresentado como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Alimentos do Programa de Pós – Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Data de Aprovação: / /

Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva (orientador)
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Elení Gomes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Márcia Justino Rossini Mutton
UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim
FERMENTEC – Piracicaba

Dedicatória

Dedico esse Doutorado a minha esposa Profa. Dra. Eurídice Bergamaschi Vicente, razão da minha vida, pelo exemplo de desenvolvimento pessoal na busca de conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus senhor da minha vida.

Aos meus pais José Vicente (in memoriam) e Sofia Helena pelo exemplo de casal e por semear sempre o espírito empreendedor.

Aos meus filhos Ângelo, Fernanda, Susana e ao nosso anjo Sofia, pelo apoio incondicional. Vocês são o orgulho da minha vida

Ao Luiz Octavio Junqueira Figueiredo, superintendente da usina que proporcionou a execução do Mestrado e Doutorado.

Ao Luiz Eduardo Junqueira Figueiredo, Luiz Gustavo Junqueira Figueiredo e Luiz Otávio Junqueira Figueiredo Filho pelo incentivo.

Ao Mário Lúcio e Ana Gabriela que foram os grandes apoiadores nos momentos de dificuldades.

Ao Prof. Dr. Henrique Amorim, Profa. Dra. Eleni Gomes, Prof. MSc. Arlélio, Prof. Dr. Antônio Sampaio Baptista, Prof. Dr. Roberto da Silva e Profa. Dra. Márcia Mutton que contribuíram significativamente em todo o processo.

Ao time da Fermentec a quem devo o aprendizado de tudo que sei sobre levedura e fermentação.

Ao time da Alta Mogiana pelo apoio ao trabalho na busca de melhores resultados na fermentação.

As pessoas especiais que passaram pela minha vida contribuindo na minha formação pessoal, profissional e espiritual Oscar Figueiredo (in memoriam), Cidisnei Gil, Celso Atienza, Roberto Rodrigues, Marcelo Tenório, Nishimura (in memoriam), Gene Field (in memoriam), Jeff Wilson, John Talbot, Eberwein's Family, Melo's Family, David Rocha, Mario Pagliaricci, Prof. Stuchi (in memoriam), Vô Ângelo José (in memoriam), José Paulo Stupielo, Joachim Fritz, Padre Lino (in memoriam), Suzana (in memoriam).

Aos amigos do rodízio Nick, Mário, Beg, Vera, Túlha, Zik e nosso querido Morta (in memoriam) por mostrarem o real valor da amizade.

RESUMO

VICENTE, F. A. C. F. **Seleção, avaliação e utilização de uma levedura personalizada para a produção de etanol.** 2015. 113 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

A produção de etanol no Brasil é baseada, principalmente, em processo de fermentação por batelada alimentada, em tanques de grande volume (250.000 a 3.000.000 de litros), com fermentação rápida (6-12 horas), utilizando altas concentrações de levedura (8-15% p/v). Entretanto, este processo está sujeito a contaminação por cepas *Saccharomyces* do meio ambiente designadas “selvagens” as quais podem causar sérios problemas ao processo fermentativo como fermentação lenta, floculação do fermento e aumento do açúcar residual no mosto fermentado. O objetivo do trabalho foi selecionar uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mais adaptada ao processo fermentativo da Usina Alta Mogiana e que constituísse um fermento robusto, dominante e persistente na fermentação industrial ao longo da safra. Os experimentos em escala industrial foram conduzidos na Usina Alta Mogiana, localizada na região de São Joaquim da Barra, estado de São Paulo. As principais etapas foram: 1) monitoramento da população de linhagens dominantes e persistentes nas fermentações por cariotipagem; 2) avaliação do desempenho fermentativo das linhagens em escala de laboratório; 3) reintrodução da cepa selecionada no processo fermentativo industrial, 4) avaliação do desempenho da cepa na escala industrial. Os resultados permitiram a seleção de uma linhagem (levedura UAM) que dominou a microbiota da dorna e permaneceu no processo fermentativo durante toda a safra. Esta linhagem permitiu os seguintes ganhos industriais: incremento no teor alcoólico do vinho de 8 para 10%, reduzindo o volume de vinhaça de 11,44 para 10,23 L/L etanol, diminuiu a contaminação por *Saccharomyces* selvagens, proporcionou uma economia de energia térmica e bagaço (15.000 ton/safra) e contribuiu para aumentar a eficiência industrial de recuperação de açúcar (de 88 para 92% do açúcar processado). Esses resultados demonstraram a viabilidade e vantagens das usinas brasileiras de terem a própria linhagem de fermento selecionada entre as cepas autóctones.

Palavras-chave: Levedura selecionada. Cariotipagem. Fermentação etanólica. Gestão de processos.

ABSTRACT

VICENTE, F. A. C. F. **Selection, evaluation and use of a customized yeast to produce ethanol.** 2015. 113 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

Ethanol production in Brazil is based on fed-batch fermentations in large volume tanks (250,000 to 3,000,000 liters), with fast fermentations (6-12hours) and high concentrations of yeast (8-15% w/v). However, this process is subject to contamination by wild *Saccharomyces* strains that may cause serious problems such as low fermentation yield, flocculation and residual sugars in the wine. The research objective was to select a *Saccharomyces* strain, more adapted to fermentation process of Alta Mogiana mill that might be a robust yeast, dominant and persistent in the industrial fermentation process during the harvesting season. Experiments in industrial scale were conducted at Alta Mogiana mill, located in São Joaquim da Barra region, state of São Paulo, Brazil. The main steps were: 1) monitoring the population of dominant and persistent strains by karyotyping; 2) evaluation of the fermentation performance of strains in laboratory-scale; 3) re-introducing of the selected strain in the industrial fermentation process; and, 4) evaluation of the strain performance in industrial scale. The results enabled the selection of a strain (yeast UAM) that dominated the microbiota of fermentation tanks and remained in the fermentation process during all harvesting season. This strain enabled industrial gains such as the increase of alcoholic content in wine from 8 to 10%, reduction of vinasse volumes from 11.44 to 10.23 L/L ethanol and lowering the contamination by wild *Saccharomyces*. Moreover, this strain provided savings of thermal energy and bagasse (15,000 ton/ harvest) and contributed to increase the industrial efficiency of sugar recovery (from 88 to 92 % of processed sugar). These results demonstrate the feasibility and benefits for Brazilian distilleries to have their own yeast strain selected among the indigenous strains.

Keywords: selected yeast, karyotyping, ethanolic fermentation, process management

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 A cultura da cana-de-açúcar e o etanol no Brasil	16
3.2 Leveduras para produção de etanol: características e fisiologia	19
3.3 Fermentação Etanólica	22
3.4 Histórico da seleção das leveduras para produção de etanol com reciclo	26
3.5 Contaminação das dornas de fermentação por leveduras	29
3.6 Cariotipagem	30
3.7 Principais problemas na fermentação	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Monitoramento das leveduras existentes – Cariotipagem	34
4.2 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas e identificadas.....	35
4.3 Multiplicação das leveduras e fermentação com reciclo de células	35
4.4 Parâmetros avaliados na fermentação em laboratório	36
4.4.1 Cálculo de rendimento fermentativo	36
4.4.2 Teor alcoólico no vinho	37
4.4.3 Determinação da viabilidade celular de levedura	37
4.4.4 Determinação dos açúcares residuais no vinho	38
4.4.5 Velocidade da fermentação	38
4.4.6 Determinação do pH	38
4.4.7 Consumo de ácido sulfúrico	38
4.4.8 Biomassa das leveduras	39

4.4.9 Formação de espuma e floculação	39
4.4.10 Avaliação da dominância e persistência das leveduras ao longo das safras	39
4.5 Parâmetros avaliados na fermentação industrial	41
4.5.1 Medição do volume de etanol produzido	41
4.5.2 Consumo de antiespumante e dispersante	41
4.5.3 Glicerol % ART mosto	42
4.5.4 Parâmetros avaliados nos resultados técnico e econômico	42
4.5.4.1 Recuperado total corrigido (RTC)	42
4.5.4.2 Medição do volume de vinhaça em relação ao de etanol produzido	43
4.5.4.3 Consumo de vapor por litro de etanol	43
4.5.4.4 Geração de vapor por tonelada de bagaço	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Monitoramentos e seleção das leveduras presentes – safras 2007 a 2010	44
5.1.1 Resumo da cariotipagem da CAT1, PE2, D1, D2, UAM e selvagens	47
5.2 Monitoramento e avaliação das leveduras D1, D2 e UAM	49
5.2.1 Floculação e espuma	50
5.2.1.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	50
5.2.1.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	52
5.2.1.3 Avaliação da floculação e espuma da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	54
5.2.2 Teor alcoólico.....	55
5.2.2.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	55
5.2.2.2. Comparação entre UAM e a levedura CAT1	57
5.2.2.3 Avaliação do teor alcoólico da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	58
5.2.3 Viabilidade celular das leveduras	59
5.2.3.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	59
5.2.3.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	60
5.2.3.3 Avaliação da viabilidade celular da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	62
5.2.4 Açúcares residuais das leveduras	62

5.2.4.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	62
5.2.4.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	64
5.2.5 Biomassa de leveduras formada durante ciclos fermentativos	66
5.2.5.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	66
5.2.5.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	67
5.2.5.3 Avaliação da biomassa celular da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	69
5.2.6 Produção de glicerol.....	69
5.2.6.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	69
5.2.6.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	71
5.2.6.3 Avaliação da produção de glicerol da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	71
5.2.7 Rendimento fermentativo	72
5.2.7.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	72
5.2.7.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	75
5.2.7.3 Avaliação do rendimento fermentativo da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	76
5.2.8 Consumo de ácido sulfúrico e pH das leveduras	77
5.2.8.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	77
5.2.8.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	79
5.2.8.3 Avaliação do consumo de ácido sulfúrico e pH da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	82
5.2.9 Velocidade da fermentação das leveduras	82
5.2.9.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2	82
5.2.9.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1	84
5.2.9.3 avaliação da velocidade de fermentação da D1, D2, PE2, UAM e CAT1	85
5.2.10 Avaliação das cepas D1, D2 e UAM em relação às leveduras PE2 e CAT1	86
5.3 Aplicação da levedura UAM nas safras 2011, 2012, 2013 e 2014	87
5.3.1 Cariotipagens das safras 2011, 2012 ,2013 e 2014	87
5.3.2 Resumo da cariotipagem da UAM – safras 2010 a 2014	89
5.4 Considerações gerais	90
5.4.1 Parâmetros avaliados durante antes e após a introdução da levedura UAM na fermentação industrial	90

5.4.2 Avaliação da dominância da UAM	93
5.5 Resultados técnicos econômicos decorrentes do uso da levedura UAM	96
5.5.1 Aumento do rendimento industrial (RTC)	96
5.5.2 Redução do volume de vinhaça	97
5.5.3 Economia no consumo de bagaço	98
5.5.4 Gasto envolvido com produto químico para combate da espuma produzida pela UAM	100
5.5.5 Avaliação geral dos resultados técnicos e econômicos	100
6 CONCLUSÕES.....	102
7 REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é inerente à história da humanidade, sendo aproveitada pelo homem, para tornar a vida melhor e mais agradável. Um exemplo interessante disto é o preparo do pão. As mudanças que ocorriam naturalmente no trigo e de outros grãos resultava em uma espécie de mingau grosso. Acidentalmente descobriu-se que a, combinação desta massa com certos resíduos orgânicos, depositados nas pedras quentes, onde ela era assada, gerava um produto mais consistente, volumoso e saboroso.

Para que ocorra a fermentação faz-se necessário a presença de bactérias e ou leveduras, sendo este último conhecido popularmente como “fermento”. Este nome surgiu da observação do processo que libertava uma espécie de fumaça (gás carbônico). Como o material que passava por tal transformação ficava, de certa maneira aquecido, os antigos pensavam que ela estava “fervendo”, daí a razão da denominação.

A produção de etanol como combustível no Brasil teve seu grande advento no Programa Nacional do Alcool, em meados de 1.970, com a utilização de amido de raízes (mandioca) e, posteriormente, da sacarose de cana-de-açúcar, como fontes de glicose para a fermentação. Desde essa época, a fermentação alcoólica vem utilizando a *S. Cerevisiae* de fermentos de pão comerciais como precursora do início da fermentação, entretanto, as leveduras de panificação não são adaptadas aos processos fermentativos das usinas e não resistem aos ciclos fermentativos e às condições estressantes da fermentação industrial cedendo lugar às leveduras selvagens contaminantes da indústria. Essa substituição natural do fermento cria situações as vezes favoráveis à fermentação, outras vezes totalmente desfavoráveis, levando a necessidade de se interromper a produção, higienizar os fermentadores e reiniciar o processo com um novo fermento comercial.

Nesse sentido, a preocupação com a qualidade e eficiência da levedura fermentativa ganhou força levando ao início da busca de cepas robustas e com alta performance fermentativa e deu início a essa pesquisa.

O acompanhamento da sucessão natural das cepas de leveduras nas dornas de fermentação pelo método de cariotipagem permitiu a identificação das primeiras cepas que reuniam características importantes de eficiência. Esse método foi descrito por Basso et al. (1993) porém com algumas modificações conforme

descrito por Lopes (2000). Entretanto, a manutenção dessas cepas selecionadas nas dornas durante toda a safra foi outro grande desafio deste trabalho. Segundo *Louis Pasteur* “*Messieurs, c’est les microbes qui around le dernier mot*” (*Senhores são os micróbios – leveduras ou bactérias – que terão a última palavra*).

A alta produção de etanol por safra fortaleceu a importância na gestão da fermentação, procurando executar em cada etapa do processo, a busca pela qualidade do mosto, alimento da levedura, bem como a preocupação com a higiene de todos os equipamentos envolvidos. Porém, a possibilidade de se possuir seu próprio fermento tornou-se prioridade no caminho de minimizar os riscos de perda de eficiência fermentativa.

A usina estudada passou por processos de produção de etanol sem decantar caldo e utilizando o processo de fermentação contínua. Todas essas etapas geraram um aprendizado árduo que levou a perda de fermentação na primeira década (1992). O sentimento de impotência e falta de conhecimento levaram a unidade a contratar uma consultoria do setor (Fermentec) que passou a transferir e desenvolver conhecimento.

Neste trabalho são descritas as etapas da pesquisa e testes de laboratório desenvolvidos durante as safras de 2007 a 2010 para seleção e identificação das cepas e os resultados obtidos com a aplicação dessas leveduras nas safras de 2011 a 2014. Os resultados confirmaram a viabilidade desse processo, o potencial lucrativo dos resultados e podem contribuir para estabelecimento da prática de que, cada usina busque sua própria levedura.

2 OBJETIVOS

2.1) Selecionar leveduras através do monitoramento das cepas predominantes no processo da Usina Alta Mogiana.

2.2) Comparar as habilidades dessas cepas com as habilidades das cepas selecionadas PE2 e CAT1 em laboratório.

2.3) Utilizar a levedura escolhida e aprovada em laboratório no processo industrial da usina, apurando os resultados técnicos e econômicos.

2.4) Demonstrar, pelo histórico de análises realizadas, as etapas que podem direcionar uma usina na busca de sua levedura personalizada, para minimizar o risco de perda de eficiência na produção de etanol pela presença de levedura contaminante.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Cultura da Cana-de-Açúcar e o Etanol no Brasil

Os derivados de petróleo expressam a maior parcela da base energética mundial. São fontes não renováveis de energia, constituem reservas limitadas e localizadas, predominantemente, em regiões de conflitos político territoriais, fatores que resultam em irregularidades de preço, fornecimento e distribuição. Além disso são fontes energéticas responsáveis por elevada liberação de gases causadores do efeito estufa à atmosfera, fenômeno que resulta no aumento do aquecimento global e em diversas alterações climáticas. Em decorrência dessas adversidades, desenvolve-se um mercado cada vez mais crescente de combustíveis derivados de biomassa, para uso em motores de combustão interna, capazes de substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis de origem fóssil (SUHAIMI et al., 2012).

A produção de etanol no Brasil está associada a fatores climáticos, econômicos e políticos nacionais e internacionais. Com a crise do petróleo em 1973/1974, foi criado em 1975, o programa nacional de produção de álcool, o PROÁLCOOL. Com o intuito de aproveitar a tecnologia já existente de produção de álcool carburante a partir da cana-de-açúcar, este programa foi fundamental para o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro no país. A partir deste momento houve grande expansão tecnológica na indústria produtora de álcool (RIBEIRO, 2008). A seleção de linhagens de leveduras, o desenvolvimento de novos equipamentos, a reestruturação das destilarias e processos fermentativos, até então obsoletos, foram algumas das melhorias conquistadas após a criação do programa (RIBEIRO, 2010).

A questão ambiental é fator que atua positivamente a favor da produção de etanol. A cultura da cana-de-açúcar tem papel muito importante neste quesito, uma vez que o etanol, um dos seus subprodutos, é uma das melhores alternativas para reduzir a emissão de gases causadores do efeito estufa, pois sua queima como combustível emite cerca de 70% menos CO₂ para a atmosfera em relação à gasolina (CONAB, 2014).

Questões ambientais começaram, então, a caminhar junto com as econômicas, devido à necessidade de reduzir as emissões de gases do efeito estufa. O etanol cujo uso é consagrado no Brasil, é exemplo de combustível

renovável. Durante o crescimento da cana, a absorção de CO_2 pelo processo fotossintético se equipara pela queima do etanol combustível, tornando neutro o balanço de emissão de CO_2 . Assim, o gás carbônico emitido na queima se reincorpora à biomassa, sem acúmulo na atmosfera (JOSEPH JUNIOR, 2008).

O relatório do Intergovernmental Panel On Climare Change (IPCC) garantiu que a atividade humana está relacionada com o aquecimento global, sendo que, o setor energético foi o que mais contribui para esse aumento devido o uso de combustíveis fósseis, sendo requerido um aumento de 3% na utilização de biocombustíveis na oferta total do setor de energia mundial antes de 2030. Isto representaria um aumento na produção de biocombustíveis na ordem de $1,0 \times 10^8 \text{ m}^3/\text{ano}$. Nesta perspectiva a participação do etanol teria que aumentar em $4,6 \times 10^7 \text{ m}^3/\text{ano}$ que seriam acrescidos a produção de $1,13 \times 10^8 \text{ m}^3/\text{ano}$ (RIBEIRO, 2008).

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar apresenta vantagens econômicas e ambientais em relação aos resultantes de outras matérias-primas. A eficiência energética produtiva a partir da cana é positiva, ou seja, a cada 9,3 unidades de energia renovável, utiliza-se uma unidade de energia fóssil. Já o derivado de milho produz apenas 1,4 e a beterraba, 2,0. As usinas brasileiras possuem auto-suficiência energética, ao utilizarem produtos do próprio processo para geração de bioenergia e apresentar maior produtividade de litros de etanol por ha^{-1} , com produção de 6,5 mil L ha^{-1} , em contrapartida o milho produz 4,2 mil L ha^{-1} e a beterraba 5,5 mil L ha^{-1} (GNC, 2014).

Segundo Conab (2014), em abril de cada ano é realizado o primeiro levantamento da safra de cana-de-açúcar no Brasil. No ano safra 2014/15 a estimativa inicial é de aumento de área cultivada em 3,6%, alcançando 9,1 milhões de hectares, distribuídas em todos estados produtores, enquanto a produção deverá aumentar somente 2,0% chegando a 671,7 milhões de toneladas.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e está em segundo lugar na produção mundial de etanol. O 1º produtor mundial de etanol com mais de 50 bilhões de litros é os Estados Unidos, que demanda 128,3 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2014).

A produção de etanol total para este levantamento da safra 2014/15 está estimada em 28,66 bilhões de litros, 705,92 milhões de litros ou 2,53% a mais do que os 27,96 bilhões de litros da safra 2012/13. Deste total, 11,80 bilhões de litros

deverá ser de etanol anidro e 16,86 bilhões de litros de etanol hidratado. A produção de etanol continua concentrada na Região Centro-Sul, com 92,93% do total produzido no país, principalmente em São Paulo (48,61%), Goiás (14,41%), Minas Gerais (10,25%), Mato Grosso do Sul (9,02%), Paraná (5,72%) e Mato Grosso (3,93%) (CONAB, 2014).

Hoje, no Brasil, consome-se uma quantidade de etanol que representa metade da gasolina que seria utilizada. Este sucesso é derivado de dois fatores fundamentais: a ampla cobertura geográfica e a comercialização do etanol hidratado e da gasolina C (gasolina comum com adição de álcool etílico anidro) por todos os postos de combustíveis do país (MANOCHIO, 2014).

A produção de etanol no Brasil é baseada, principalmnete, na fermentação do caldo de cana de açúcar, rica em sacarose; enquanto nos Estados Unidos, a principal fonte de açúcar é o amido de milho e na Europa, as duas fontes são utilizadas (MABEE, 2007; OTERO; PANAGIOTOU; OLSSON, 2007).

O etanol é produzido pela fermentação da glicose por leveduras, obtida a partir de sacarose, do amido e, mais recentemente, a partir da hidrólise da lignocelulose. As matérias-primas amiláceas, como, o milho, o trigo e outros grãos, necessitam da hidrólise do amido em glicose através de um processo enzimático. No caso das matérias-primas açucareiras, como é o caso da cana-de-açúcar e beterraba, a sacarose é invertida a glicose e frutose diretamente por invertase da própria levedura, não requerendo, portanto, etapa de processamento prévio (MANOCHIO, 2014).

O etanol pode ser fabricado por via química ou fermentativa. A primeira é aplicada esporadicamente no Brasil, e efetuada a partir de hidrocarbonetos não saturados (eteno e etino), de gases do petróleo e de hulha. É uma forma competitiva, que apresenta bom potencial de expansão nos próximos anos. A via fermentativa, no entanto, é a mais importante no Brasil. Essa forma sempre terá importância tanto na produção de combustível como também de aguardente (AMORIM; LEÃO, 2005).

Para o Brasil se manter como o maior produtor de açúcar e etanol, a matéria-prima, requer parâmetros de qualidade que são imprescindíveis para garantir um produto final de qualidade e em grande quantidade. Para Albuquerque et al. (2012), a qualidade final dos produtos está relacionada à composição da matéria-prima, tais como, os teores de açúcares, fibra e os não açúcares. A maior

presença de não açúcares como compostos fenólicos, dextrana, amido, ácidos orgânicos, proteínas, cera e compostos inorgânicos, afeta a qualidade do açúcar produzido, assim como a quantidade de etanol, devido a influência destes elementos na fisiologia da levedura em fermentação.

3.2 Leveduras para produção de etanol: características e fisiologia

Leveduras são células eucarióticas unicelulares, facilmente manipuláveis, capazes utilizar diferentes fontes de carbono. Tais características tornam esses micro-organismos um dos mais adequados para estudos de processos biológicos peculiares aos organismos eucarióticos, pois eles apresentam características estruturais e funcionais de eucariotos superiores (SILVA, 2010).

As leveduras são encontradas no solo, nas superfícies de vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, e em líquidos açucarados (STECKELBERG, 2001). Possuem a forma esférica, ovoide, globosas ou alongadas. Apresentam de 1 a 8 µm de largura e 3 a 15 µm de comprimento, variando de acordo com idade e ambiente (ALCARDE et al., 2007).

As leveduras podem multiplicar-se por gemulação (brotamento), esporulação ou por fissão binária. O método mais comum é o de gemulação (brotamento), sendo que durante sua vida uma célula madura (célula mãe) pode gerar até 24 brotos (células filhas). (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

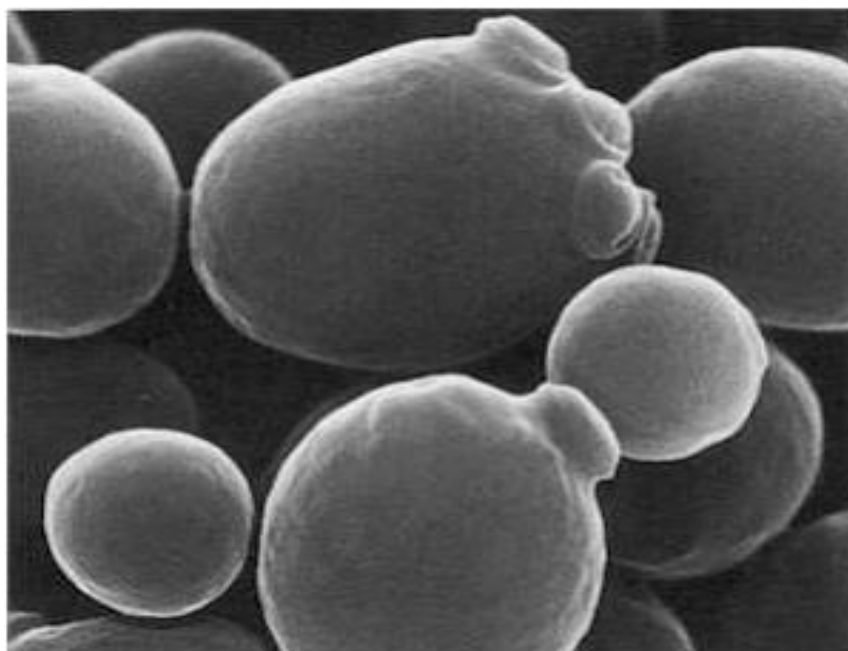
O primeiro sistema de identificação que descreve muitas das espécies de leveduras conhecidas nos dias atuais, foi proposto por Emil Christian Hansen em 1896 que considerou as características fisiológicas, habilidades de fermentação da glicose, e demais açúcares e assimilação de compostos nitrogenados para estabelecer o procedimento para classificação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). As leveduras constituem o grupo mais importante de micro-organismos comercialmente explorados e empregados na obtenção de etanol, especialmente em função da capacidade fermentativa. As leveduras alcoólicas pertencem ao domínio Eukaryota, reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetaceae (ALCARDE et al., 2007), sendo a levedura *S. cerevisiae* a mais amplamente utilizada na indústria de fermentação para a produção de bioetanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

A espécie *S. Cerevisiae* cresce eficientemente em condições aeróbias ou por fermentação. Em condições de aerobiose e em baixas concentrações de glicose (menos de 2%), apresenta crescimento rápido permitindo a obtenção de elevadas quantidades de biomassa em tempo curto.

A fermentação alcoólica clássica no Brasil, é realizada com reutilização de células da levedura *S. Cerevisiae*, porque evitam os custos com a propagação do inóculo, com o consumo adicional de açúcar e demanda de tempos mais longos de fermentação (BAI et al., 2008). Nas destilarias brasileiras, o excedente de biomassa é retirado antes do início de cada novo ciclo de fermentação e utilizado no preparo de ração animal (CECCATO – ANTONINI, 2008).

A produção mundial de etanol combustível está em torno de 75 bilhões de litros por ano, grande parte deste total (cerca de 95%) é produzido pela fermentação de glicose oriunda da sacarose da cana de açúcar, beterraba e ao amido do milho pela levedura *S. cerevisiae* (SILVA, 2012; TIBAYRENC; BELLOY; GHOMMIDH, 2011).

Figura 1. Fotomicrografia da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
Fonte: MIRANDA JÚNIOR, 2008.



Devido ao progresso da tecnologia de produção de álcool as linhagens de leveduras foram sendo selecionadas buscando-se características desejáveis ao processo e ao produto. Características como produtividade, eficiência da fermentação, tolerância ao etanol e à temperatura e resistência às altas concentrações de açúcares são alguns dos principais fatores que são considerados na escolha de uma levedura (HAMMOND, 1995).

As cepas selecionadas são aquelas melhor adaptadas às condições industriais, que proporcionam rendimentos acima de 92% do açúcar total garantindo uma quantidade menor açúcar residual no vinho que 0,1% de, numa fermentação rápida (8-12 horas), tolerância ao etanol, baixa produção de espuma e sem floculação. Muitas vezes, linhagens com ótimas propriedades fermentativas não sobrevivem aos ciclos fermentativos e são rapidamente substituídas por leveduras contaminantes, floculantes, causando sérios prejuízos para indústria. Em alguns casos, as perdas de açúcar no vinho ultrapassam 1%. Para uma usina com 7 dornas de 1 milhão de litros e um ciclo fermentativo de 12 horas, isso significa uma perda de 140 toneladas de açúcar (FERMENTEC, 2012).

Os processos fermentativos com maiores rendimentos são aqueles que utilizam cepas selecionadas para obtenção do etanol (FIGUEIREDO, 2012). Atualmente, muitas indústrias alcooleiras utilizam como iniciadoras do processo fermentativo cepas de *S. cerevisiae* que foram previamente isoladas de unidades brasileiras, por apresentarem, além de alta eficiência na fermentação bem adaptadas ao ambiente industrial permanecendo durante todo o período da safra. Alguns exemplos dessas linhagens selecionadas através de cariotipagem são as das usinas Barra Grande (BG-1 Copersucar), Catanduva (CAT-1 - Fermentec/ESALQ), Usina da Pedra (PE-2 -Fermentec/ESALQ) e Santa Adélia (SA-1-Copersucar) (REIS, 2011; BASSO et al., 2008).

Segundo Amorim e Lopes (2013), atualmente cerca de 70% de todo o álcool no país é produzido por essas cepas selecionadas, ou seja, 16 bilhões de litros por ano. Cinco linhagens de leveduras industriais se destacaram até o momento: PE2, CAT1, FT858L, BG1 e SA1. Estas leveduras foram selecionadas por apresentarem características de persistência e dominância nas fermentações industriais com reciclo de células ao longo da safra de cana-de-açúcar, assim como capacidade de importância industrial como elevado rendimento fermentativo, pouca formação de espumas, apresentam boa velocidade de fermentação e não são floculantes.

Aproximadamente 170 destilarias em todo país (41% das unidades industriais) fazem uso destas selecionadas.

As leveduras CAT1 e PE2 (representam 70% das linhagens de levedura do mercado brasileiro para produção de etanol), isoladas da Usina Catanduva e Usina da Pedra, respectivamente, na década de 90. Ambas estão presentes em grande parte das unidades alcooleiras brasileiras. Contudo, deve-se destacar a levedura FT-858L, disponibilizada comercialmente apenas em 2011 pela Fermentec, que demonstra elevado potencial principalmente quando utiliza-se matéria-prima resultante de colheita de cana crua (AMORIM, 2011).

A selecionada PE2 foi introduzida pela primeira vez em 1995/1996 em 24 destilarias, mostrando elevada capacidade e permanência no processo fermentativo. Desde então, passou a ser utilizada como estirpe de referência industrial, comparada com o fermento biológico de panificação utilizado na indústria de alimentos (DELLA-BIANCA, et al. 2013).

As cepas selecionadas quando avaliadas em laboratório sob condições que imitavam todas as etapas dos processos industriais apresentaram ganhos de rendimento de 3% sobre as leveduras de panificação (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). Em termos relativos, pode significar pouca quantidade, mas para uma unidade que produz um milhão de litros de álcool por dia, significa 30.000 litros a mais. Diversas usinas passaram então, a iniciar a safra com leveduras selecionadas. No entanto, muitas unidades ainda utilizam leveduras de panificação, de laboratório, cervejaria, e de outras origens.

3.3 Fermentação Etanólica

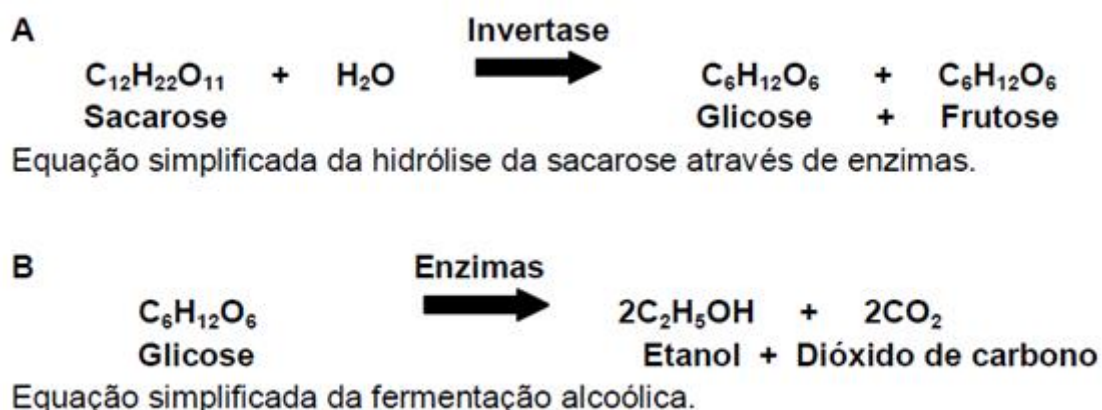
A fermentação etanólica é um processo bioquímico que transforma glicose em etanol, e gás carbônico como produtos principais, além de glicerol, ácidos succínicos, ácidos voláteis e ésteres, como metabólicos secundários. A levedura caracteriza-se por ser um micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, apresenta capacidade de se desenvolver metabolismo aeróbio oxidativo, ou fermentativo dependendo das condições de aerobiose ou de anaerobiose, (RAVANELI, 2010).

Em condições aeróbias, com a presença de oxigênio no meio e em baixa concentração de glicose, a levedura metaboliza os carboidratos para produção de ATP e biomassa. Neste processo uma molécula de glicose produz cerca de 38 ATPs

e 47g de biomassa. Sob condições anaeróbias, induzidas pela ausência de oxigênio, e em elevadas concentrações de açúcares no mosto, a levedura metaboliza a molécula de glicose, até a formação de etanol e CO₂, havendo produção de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose e baixa produção de biomassa (VENTURINI FILHO et al. 2013).

A metabolização do açúcar e conversão em etanol pela levedura ocorrem no citoplasma celular e envolvem 12 reações sequenciais e ordenadas, catalisadas, cada uma, por uma enzima específica (WALKER, 1998).

Figura 2. Equação simples da produção de etanol - Fonte: GOMES (2014)



Firmino Boinot durante a década de 30, desenvolveu o processo de fermentação nas usinas na região de Melle, França (AMORIM e LOPES, 2004). Com o início do Pro-álcool, partir da década de 70, diversas melhorias neste processo foram introduzidas nas usinas. Dentre estas melhorias destacam-se as leveduras industriais, modificações nas condições do processo de fermentação, como controle da contaminação bacteriana, a concentração de biomassa de levedura no vinho, a geometria das dornas, a condução do processo propriamente dito, assim como o desenvolvimento da produtividade e qualidade da cana-de-açúcar.

As melhorias no processo de fermentação etanólica permitiram que as destilarias brasileiras alcançassem rendimentos de 92- 93% em relação ao rendimento teórico por Gay-Lussac (100% de rendimento corresponde a 1g de

glicose transformada em 0,511g de etanol e 0,489g de CO₂) (AMORIM, 2006). Segundo Amorim (2005) a fermentação industrial apresenta células de leveduras com viabilidades próximas a 90%, pois nestas condições há fermentações rápidas, com elevado teor de etanol e baixa concentração de açúcar residual nos vinhos.

Além de uma boa cepa, as condições de fermentação influenciam significativamente no rendimento almejado. O preparo adequado do mosto é uma etapa inicial de grande importância. Para que o processo fermentativo ocorra adequadamente é necessário que aconteça uma etapa prévia de clarificação do caldo. Nos decantadores ocorre o aquecimento do caldo, correção do pH para faixa de 6,0 – 7,0 e adição de polímeros, que irão auxiliar na precipitação e remoção de colóides, impurezas minerais, bagacilhos, gomas e compostos nitrogenados. Este processo desfavorece a formação de espuma durante a fermentação, o acúmulo de sujeira nas colunas e reduz a presença de micro-organismos indesejáveis (OLIVEIRA FILHO, 2010). Atualmente o pH do caldo não sofre correção (5,0 a 5,6), deixando seu valor natural quando este se destina para produção de etanol.

Para a fermentação alcoólica é imprescindível que o pH do mosto esteja entre 4,0-4,5, uma vez que a cepa apresenta características acidófilas (SHANKAR et al., 2014). Neste sentido, esta faixa de pH contribui ainda para a redução da carga microbiana presente no substrato, pois grande percentual das bactérias providas do campo apresentam características neutrófilas. Deve-se destacar ainda, que o pH do caldo original varia entre 5,0-5,6. (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Entretanto, durante o tratamento ácido do levedo o pH fica entre 2,0 e 2,5.

Outro fator essencial para desenvolvimento da linhagem e boa fermentação do mosto é a concentração adequada de açúcares do meio. Esta não deve ser elevada, pois, substratos com teores elevados de açúcares, mesmo com disponibilidade de oxigênio, reprimem a respiração das leveduras que tendem a fermentar pela inibição da síntese de enzimas respiratórias e inatividade das mitocôndrias. O mosto deve ser preparado com a concentração de açúcar conforme o tipo de levedura a ser utilizado, a composição da matéria-prima, e com o processo de condução da fermentação. Elevadas quantidades de açúcares favorecem teores alcoólicos maiores, entretanto, comprometem a viabilidade celular, ocasionando fermentações incompletas, com maior formação de ácidos e glicerol (STUPIELLO; HORII, 1981).

O mosto, antes de chegar à fermentação, deve ser aquecido a temperatura de até 105°C para a eliminação de alguns micro-organismos contaminantes. O restante das impurezas é removido através de decantação para a obtenção de um caldo mais limpo para evitar resíduos nas colunas de destilação. Em seguida, o mosto deve passar por resfriamento a aproximadamente 30°C para ser enviado às dornas de fermentação (ALCARDE, 2007).

Grande variedade de substratos pode ser utilizada pela levedura. Estes devem apresentar valores de pH entre 3,5 a 6,0 e temperaturas de 28 a 35 °C que são considerados ideal para o seu crescimento e desenvolvimento, é nesta faixa que as enzimas invertases da levedura, responsáveis pela inversão da sacarose liberando glicose e frutose, atingem estabilidade e máxima atividade (SHANKAR et al., 2014).

Algumas adversidades são encontradas no processo fermentativo de produção de etanol durante o período de safra e, como consequência, o fermento torna-se totalmente vulnerável à contaminação microbiana, como bactérias e outras leveduras (leveduras selvagens), que consomem os açúcares presentes no mosto produzindo compostos não etanol, tais como ácidos orgânicos (lático, acético, etc), diminuindo o rendimento industrial (CAMOLEZ; MUTTON, 2005; MOREIRA et al. 2013).

A ação dos micro-organismos pode ainda resultar na floculação e morte das cepas selecionadas, utilizadas no processo fermentativo (NOBRE et al., 2007). Sendo assim, é necessário obter controle rápido e eficaz para minimizar a contaminação bacteriana e, por consequência, reduzir a acidez do meio, resultando em um processo fermentativo de alto desempenho (DE CARVALHO; MONTEIRO, 2011).

Quando em temperaturas elevadas (40 °C), as leveduras apresentam taxa inicial da produção de etanol maior, porém ao decorrer do processo fermentativo, esta é reduzida devido à inibição causada pelo próprio etanol à levedura (KOSARIC, 2001). Segundo Lima, Basso e Amorim (2001) temperaturas superiores, além de promover perdas de etanol produzido por evaporação, também afetam diretamente o micro-organismo fermentador, provocando desordens na membrana, desnaturação de proteínas, aumento no armazenamento de trealose, inibição da glicólise, resultando em mutação ou até mesmo em morte da levedura.

Um importante campo de pesquisa em fermentação alcoólica é a busca por novas linhagens de leveduras com alta tolerância à temperatura e etanol, e capazes de produzir vinhos fermentados de alta concentração alcoólica, bem como identificar os fatores relacionados à condição atual de processo que impedem a condução do processo de fermentação no limite da tolerância das leveduras industriais. A conjugação desses fatores numa linhagem de levedura seria bastante atrativa na medida que produziria redução no consumo de água de resfriamento, redução no volume de vinhaça, além da redução de consumo de energia na destilaria como um todo (MIRANDA JUNIOR, 2012).

3.4 Histórico da Seleção das Leveduras para Produção de Etanol com Reciclo

O setor sucroenergético utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima, uma gramínea tropical que acumula sacarose, a qual é convertida em etanol diretamente pela levedura. O ambiente de fermentação é complexo, principalmente, em processos que utilizam o caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima, ocorre uma sucessão intensiva de linhagens de leveduras no mosto de fermentação. O início do processo fermentativo ocorre na presença de linhagem ditas como boas fermentadoras e capazes de dominar o processo durante toda a safra, são utilizadas como biomassa tanto na unidade em que foi isolada, como em outras unidades (MOREIRA et al., 2103).

A produção de etanol no Brasil é basicamente realizada por dois processos: a fermentação em batelada alimentada e a fermentação contínua, com reciclo de células, de forma que contaminantes bacterianos também são reciclados e podem causar problemas devido à competição pelo mesmo substrato. A fermentação em batelada alimentada é utilizada por cerca de 85% das destilarias brasileiras, enquanto que, a fermentação contínua está em 15% das unidades industriais (GODOY et al., 2008).

Os dois processos apresentam características diferentes, dentre outras, o número, distribuição e geometria das dornas, automação, sistema de alimentação, periodicidade de limpeza das dornas, contaminação bacteriana, gasto com insumos, condições de estresse sobre a levedura, entre outras características. Porém, as fermentações em batelada têm proporcionado resultados melhores quanto ao

rendimento da fermentação, controle da contaminação bacteriana e economia com insumos (GODOY et al., 2008).

O controle do crescimento bacteriano é feito pela adição de ácido sulfúrico na lavagem das células do fermento ou utilização de biocidas (BASSO et al., 2008; MENEEGHIN et al., 2008). A fermentação é conduzida em temperatura de 33 a 34°C por 6 a 12 horas, dependendo da concentração de açúcares no mosto. Durante o período de safra (cerca de 200 dias) este procedimento é repetido aproximadamente 400 vezes, ou seja, são dois ciclos por dia como descrito por Amorim et al. (2011).

O processo de fermentação denominado Melle-Boinot é o mais utilizado no Brasil. Após o processo fermentativo, a levedura é separada do mosto fermentado (vinho) por centrifugação sendo que poucas unidades reciclam o levedo por sedimentação para produção de etanol (combustível). Estas serão recuperadas, tratadas em cubas, recicladas e empregadas em um novo processo para a realização de nova fermentação, enquanto o vinho segue para a recuperação do etanol através do processo de destilação em colunas (ALCARDE, 2007).

Segundo Oliveira e Pagnocca (1988), a levedura sofre inúmeras reciclagens tornando-a susceptível à contaminação por outras leveduras, oriundas da biodiversidade ambiental. Estas leveduras selvagens, conforme suas características, podem acarretar sérios prejuízos no rendimento final de produção de etanol. Andrietta et al. (2007) isolaram e avaliaram algumas dessas leveduras selvagens quanto ao potencial fermentativo na produção de etanol e constataram a hegemonia e rusticidade dessas linhagens aliados a um ótimo desempenho fermentativo.

Durante as reciclagens as células passam por inúmeras interferências externas oriundas do caldo, do ambiente e outras fontes, tornando-as vulneráveis a contaminação bacteriana e mesmo de leveduras selvagens, além de que também são expostas constantemente a condições estressantes como altas temperaturas, álcool, baixo pH, componentes inibitórios do melaço, metabólitos produzidos por bactérias, excesso ou deficiência de sais e minerais (AMORIM et al., 2011).

Em vista das concentrações elevadas de etanol ao fim de cada ciclo de fermentação, entre 8 e 12% (v/v), o álcool é um dos principais fatores de estresse que agem sobre a levedura. O principal alvo do etanol é considerado a membrana citoplasmática das células. A fluidez da membrana, a qual está relacionada com a sua composição lipídica, é profundamente alterada na presença de etanol e, como

resultado, a permeabilidade da membrana para alguns íons (especialmente íons H⁺) é significativamente afetada (BASSO *et al.*, 2011).

O estresse por etanol pode ser intensificado pela alta temperatura e acidez, e todos esses fatores estressantes são impostos simultânea ou sequencialmente para as leveduras (DORTA, 2006). A entrada dos íons nas células, alteram a formação e manutenção da força motriz com subsequente diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana, o etanol pode inibir o crescimento e causar inativação enzimática, levando a uma diminuição da viabilidade celular (BASSO *et al.*, 2011).

A tolerância ao etanol é um fenótipo complexo, sendo que mais de 250 genes parecem estar envolvidos com essa característica. A maioria destes genes está relacionada com o metabolismo da energia, a síntese lipídica, homeostase iônica e síntese de trealose (BASSO *et al.*, 2011).

Nos ciclos as células não podem ser apenas centrifugadas e adicionadas novamente aos reatores, é necessário que elas passem por um tratamento de descontaminação evitando assim a contaminação bacteriana, para iniciar a fermentação nas condições ótimas. Este tratamento consiste na incubação do leite de levedura em água e ácido sulfúrico até pH 2,5 por aproximadamente 2 horas, para posteriormente iniciar uma nova fermentação (SOUZA *et al.*, 2007).

A vantagem de realizar ciclos com células é que ao invés das células converterem o açúcar em biomassa celular, mais açúcar será convertido em etanol se comparado aos processos sem ciclo de célula. Uma desvantagem pouco estudada em produção de etanol combustível é o surgimento de mutantes a medida que o processo continua sob condições de estresse (SOUZA *et al.*, 2007).

As células de levedura devem manter a viabilidade alta ao final de cada ciclo de fermentação, a fim de resistir ao ciclo. É por isso que uma determinada linhagem pode ter um bom desempenho em um ciclo de fermentação, com um teor final de etanol de 18% (v/v), mas as células de baixa viabilidade não podem ser utilizadas nos ciclos subsequentes de fermentação (BASSO *et al.*, 2011).

3.5 Contaminação das dornas de fermentação por leveduras

A característica microbiológica da cana-de-açúcar que entra no processo de extração das unidades sucroenergéticas no Brasil normalmente apresenta altos níveis de microrganismos contaminantes, sejam eles bactérias, leveduras ou fungos (OLIVA-NETO E YOKOYA, 1994). Isso porque, segundo Dorta (2006) o processo de batelada alimentada ou contínuo com o reciclo de célula, utilizado nas usinas sucroenergéticas favorece a proliferação de alguns gêneros contaminantes nas dornas fermentativas.

Segundo Narendranath et al. (1997), a contaminação por bactérias lácticas é um dos maiores problemas da fermentação industrial de etanol. O crescimento das referidas bactérias reduz o rendimento alcoólico devido o consumo de glicose que seria destinada à síntese etanólica, além da competição dos nutrientes do meio, e do efeito tóxico do ácido láctico. Tais bactérias podem induzir a floculação do fermento causando o assentamento de células de leveduras no fundo das dornas e perda de células nas centrífugas contribuindo ainda mais para a diminuição do rendimento, produtividade e viabilidade celular (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994).

Embora, muitas indústrias utilizem cepas selecionadas de *S. cerevisiae* como iniciadoras, a condição não estéril dos substratos torna este processo sujeito a constantes contaminações por bactérias e linhagens de leveduras nativas de *S. cerevisiae* e *não-Saccharomyces cerevisiae* (ANTONANGELO, 2012).

Pode-se definir levedura contaminante ou selvagem como qualquer levedura presente no processo fermentativo, que não seja a levedura selecionada para a condução da produção de álcool. Leveduras contaminantes podem sobrepujar o fermento em poucos dias, já no início da safra, devido à alguns fatores como agressividade na competição por nutrientes, maior velocidade de multiplicação, pressão de seleção favorável e proporção inicial significativa. Estes fatores ainda são pouco conhecidos para casos específicos (TAVARES, 1992).

Estas leveduras selvagens dominam rapidamente a população iniciadora do processo por serem cepas genética e fisiologicamente adaptadas às condições daquele ambiente. Tais leveduras podem prejudicar o processo fermentativo, porém, algumas entre elas, podem apresentar características positivas (ANTONANGELO, 2012).

No mundo todo, diferentes métodos de análise já foram empregados para monitorar a população das cepas de levedura, principalmente durante o processo de fermentação do vinho (KISHIMOTO et al., 1994).

No Brasil, diversas indústrias fazem acompanhamento da contaminação do mosto através de cariotipagem (FERMENTEC, 2008). No entanto, este é um método caro e demorado, pois exige grande volume de DNA para o processamento da amostra. Além disso, o alto polimorfismo cromossômico observado em linhagens industriais devido a rearranjos mitóticos em resposta ao estresse causado pelo processo de fermentação pode originar produtos que migrem em diferentes posições em relação às bandas parentais, dificultando a interpretação dos resultados (SILVA-FILHO, 2005).

3.6 Cariotipagem

A detecção de leveduras contaminantes no processo de fermentação e a diferenciação destas em relação à levedura do processo selecionada, não são tarefas fáceis. Vários métodos tem sido propostos, incluindo técnicas moleculares como a cariotipagem, por exemplo (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 1996).

A cariotipagem é um método de análises utilizado para distinguir as leveduras selecionadas das contaminantes. A partir de colônias isoladas de leveduras são extraídos cromossomos intactos que são então separados num campo elétrico. As variações no tamanho e número de cromossomos funcionam como “impressões digitais” que permitem identificar as leveduras selecionadas e diferenciá-las das selvagens contaminantes (FERMENTEC, 2008).

No Brasil várias indústrias acompanham a dinâmica populacional da fermentação por cariotipagem. No entanto este método é dispendioso, demorado e pouco acurado quando se compara a outros métodos moleculares mais sensíveis (ANTONANGELO, 2012).

A cariotipagem monitora a permanência e dominância das leveduras introduzidas na fermentação; identifica leveduras contaminantes durante a safra e sua proporção; seleciona novas leveduras (personalizadas) mais adaptadas ao seu processo; associada ao teste de potencial fermentativo, permite distinguir quais são as leveduras de melhor desempenho, de menor formação de espuma e as não floculantes (FERMENTEC, 2012).

As usinas que fazem análises periódicas de cariotipagem obtêm os seguintes benefícios: identificação com rapidez das leveduras contaminantes e os fatores que levam à contaminação e orientações para corrigir ou melhorar seus processos; conhecimento de quais leveduras que melhor se adaptam às fermentações; otimização dos recursos fazendo o planejamento de compras das leveduras e multiplicação pelo grupo que representam ou de acordo com a necessidade de cada unidade; economizam com gastos desnecessários no início de safra ao utilizar leveduras que “desaparecem” das fermentações e acabam dando espaço para linhagens contaminantes e possuem melhor controle do processo industrial conhecendo quais são as leveduras dominantes e as suas características (FERMENTEC, 2012).

Este conhecimento se traduz, em maior eficiência, melhor desempenho fermentativo e maior economia com insumos através da seleção de leveduras personalizadas, mais robustas e adaptadas a cada processo industrial.

A frequência com que se deve utilizar do método de cariotipagem é de no mínimo uma análise por mês, embora muitas destilarias já comprovaram o benefícios de fazer um monitoramento constante e intensivo da população de leveduras, buscando a otimização de resultados e a excelência de seus processos de fermentação (Fermentec, 2012).

Andrietta et al. (2011) observaram substituição da população de leveduras no processo fermentativo ao monitorarem a safra da Usina São Manoel, através de cariotipagem.

3.7 Principais problemas na fermentação

Os substratos adicionados às dornas de fermentação (melaço e ou calda de cana), normalmente, não são esterelizados, dessa forma a fermentação etanólica passa a ser considerada um processo complexo com sucessões intensas de linhagens de leveduras. Isto favorece o desenvolvimento de linhagens de leveduras selvagens que podem causar a diminuição da produtividade e outros problemas operacionais. Muitas vezes essas leveduras apresentam fenótipos como floculação, formação de espumas e crescimento invasivo que, os quais são característica indesejáveis para a indústria (FIGUEIREDO, 2008).

O fator mais crítico da contaminação das fermentações por leveduras, bactérias e fungos especialmente nas destilarias que extraem levedura para secagem, é a floculação. Esse fenômeno ocorre quando há interação entre os lactobacilos e a levedura, potencializado por altas concentrações de cálcio no mosto. Tais condições levam as bactérias a se aderirem nas paredes das leveduras, por meio de ligações entre moléculas constituintes da superfície desses microrganismos, fazendo com que toda biomassa se precipite (VENTURA; ZINK, 2002).

A floculação impede a ação do antibacteriano por impedir o contato da substância utilizada no processo e a bactéria. Devido a isso, não ocorre a diminuição da proliferação desses contaminantes, que provocam aumento de acidez, devido produção de ácidos orgânicos que prejudicam a qualidade do etanol produzido, tanto na indústria sucroalcooleira quanto para a indústria de alimentos (ALTERTHUM et al., 1984).

Segundo Basso et al. (2008), a floculação do fermento usado nas indústrias produtoras de etanol leva à decantação das leveduras nos fundo das dornas e dificulta a conversão do açúcar em etanol porque, para uma máxima conversão de açúcar em etanol e gás carbônico, é essencial que as leveduras permaneçam suspensas no líquido de fermentação e não floculadas. Este fenômeno causa perda de células na centrífuga e a obrigatoriedade de reposição celular, trazendo gastos para o processo e proporcionando queda no rendimento alcoólico (LUDWIG; OLIVANETO; ANGELIS, 2001).

Alguns tipos de biótipos de leveduras selvagens apresentam características de alto crescimento, permanecendo na superfície das dornas, formando um espécie de espuma grossa e pegajosa, em quantidade excessiva, causando o extravasamento do mosto das dornas de fermentação e conseqüentemente, perda de açúcar e álcool (CECCATO-ANTONINI; PAPARAZZI, 1996). De acordo com Figueiredo (2008) as leveduras contaminantes dos processos industriais de fermentação alcoólica no Brasil apresentam a característica de formação de espuma associada à hidrofobicidade da parede celular.

Outro problema que ocorre na fermentação alcoólica é que do etanol e do gás carbônico, são formados produtos secundários de interesse metabólico relacionados com a adaptação e sobrevivência da levedura. A formação desses subprodutos depende de uma série de fatores, os principais são o tipo de matéria-prima, a linhagem de levedura empregada e o processo de fabricação de etanol.

Freqüentemente, encontram-se os seguintes subprodutos, considerados inibidores da fermentação: glicerol, ácido succínico, ácido acético, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, gás sulfídrico e furfural (MARTÍN et al., 2007).

A quantidade de cada subproduto formada é dependente do estresse causado às leveduras, geralmente por contaminação bacteriana, altas temperaturas, carência ou excesso de nutrientes e tratamento ácido incorreto. Dentre os principais subprodutos formados tem-se o glicerol, ácidos orgânicos, óleo fúsel e os carboidratos de reserva trealose e glicogênio. O glicerol é o composto secundário encontrado em maior quantidade. É formado em decorrência de estresses físicos (pressão osmótica), químico (presença de sulfito no mosto) e microbiológico (contaminação bacteriana). Em geral, é uma resposta ao estresse osmótico quando se trabalha com altas concentrações de açúcares ou sais no mosto (PACHECO, 2012).

A formação de glicerol pela levedura está relacionada com a estabilização osmótica do organismo já que é dada como resposta ao estresse osmótico ao qual a célula está sendo submetida, devido à alta concentração de açúcar no mosto de fermentação. Comparando-se o metabolismo em termos energéticos, a via aeróbia é mais eficiente em produção de energia que a via anaeróbia, gerando assim mais ATP para manutenção celular (MARTINS, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Usina Alta Mogiana (UAM) onde foi realizada a pesquisa, está localizada em, São Joaquim da Barra Estado de São Paulo. Esta planta industrial foi a quarta unidade do Brasil em volume de processamento de cana nos anos 2012, 2013 e 2014. Possui as certificações: ISO 9001 (Qualidade – 15 anos), OHSAS 18001 (Segurança- 10 anos), FSSC 22000 (Alimento Seguro – 6 anos) e ISO 14001 (Meio Ambiente – 4 anos), além do selo ABRINQ e certificação de créditos em carbono. A UAM iniciou sua operação em 1985, e produziu somente etanol por 9 anos, iniciando a produção conjunta de açúcar em 1994. Possui como recordes de safra a produção de 180.000.000 m³ de etanol e 10.600.000 sacas de 50 kg de açúcar, em 2010.

As análises de laboratório foram executadas na empresa Fermentec, localizada em Piracicaba – São Paulo.

4.1 Monitoramento das leveduras existentes - Cariotipagem

O monitoramento das leveduras existentes no processo industrial foi realizado através de amostra retirada da fermentação, sendo referenciada pelo número de dias de operação da indústria. Como exemplo verificamos que as amostras da safra 2007 foram retiradas aos 25, 34, 134 e 187 dias de operação (figura 5, página 42).

Com o decorrer do trabalho percebemos a necessidade de aumentar a quantidade de amostras, variando-as de 6 a um máximo de 9 amostras / safra. Essa amostra foi enviada para laboratório especializado com a finalidade de se identificar as leveduras existentes na referida data, através da comparação dos perfis cromossômicos existentes com os perfis de leveduras selecionadas conhecidos, identificando-os. Caso esse perfil não fosse conhecido, denominou-se a (s) cepa (s) como selvagem.

Esse monitoramento iniciou-se em 2007 e foi realizado durante todas as safras, sendo a principal ferramenta utilizada para conhecimento das cepas presentes na usina estudada. O procedimento está descrito em detalhes no item 4.4.10.

4.2 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas e identificadas.

A usina estudada optou por sempre iniciar seu processo produtivo utilizando as cepas de leveduras selecionadas: PE2 (isolada da Usina da Pedra, localizada no município de Serrana-SP) e a cepa CAT1, (isolada da Usina VO-Catanduva, localizada no município de Catanduva-SP). Essa escolha buscou contar com um exército de leveduras com habilidades de importância industrial como elevado rendimento, pouca formação de espuma, não são floculantes e apresentam boa velocidade de fermentação. Elas também foram utilizadas como leveduras padrão na comparação com as cepas que mostraram-se dominantes e persistentes.

Durante o monitoramento foram isoladas leveduras que permaneceram no processo durante a safra 2007, 2008, 2009 e 2010 passando a ser identificadas pela denominação D1, D2 e UAM.

4.3 Multiplicação das leveduras e fermentação com reciclo de células

As leveduras PE2, CAT1, D1, D2, UAM foram multiplicadas em mosto de melaço da Usina Alta Mogiana para formação de biomassa celular necessária aos experimentos com reciclo de células. O melaço foi diluído com água destilada até 6% de açúcares totais e utilizado para multiplicação das leveduras. A multiplicação foi conduzida até se obter biomassa celular o suficiente para iniciar os experimentos. Os experimentos de fermentação com reciclo de células foram realizados com volumes de 80mL de vinho bruto em tubos de vidro para centrífuga com capacidade máxima para 150 ml.

Para a fermentação com reciclo de células, a biomassa das leveduras foi adicionada aos tubos de centrífuga e ajustada para representar 10% (p/v) do volume final de vinho bruto (80mL). Em seguida, foi realizada a alimentação que consistiu da adição do mosto de melaço da Usina Alta Mogiana (volume total de 60 mL) contendo uma concentração de açúcares totais de 20 a 25% (p/v) de acordo com o experimento e ciclo fermentativo. Após a alimentação do mosto, os tubos foram imediatamente pesados e transferidos para estufa, sendo a fermentação conduzida à temperatura de 32 ± 1 °C.

A velocidade do processo fermentativo foi acompanhada através da pesagem dos tubos a cada hora para estimar a perda de peso causada pela eliminação do CO₂ produzido durante a fermentação. No primeiro experimento,

realizado com as leveduras D1, D2 e PE2 as fermentações foram finalizadas após 9 horas enquanto que, no experimento realizado com a levedura UAM e CAT1, as fermentações foram conduzidas por até 12 horas. Ao final das respectivas fermentações, os vinhos brutos foram centrifugados a 800g durante 20min (centrifuga Cientec) para a separação das células das leveduras. As biomassas obtidas foram pesadas, diluídas em água (70% p/v) e tratadas com ácido sulfúrico (1N) o suficiente para atingir pH entre 2,0 a 2,5. Após 1,5 hora à temperatura ambiente, as células das leveduras foram alimentadas novamente com mosto para iniciar um novo ciclo fermentativo. Para as leveduras D1, D2 e PE2, o experimento foi conduzido por 3 ciclos fermentativos enquanto que para a levedura UAM e CAT1 foram realizados 5 ciclos.

Os experimentos foram conduzidos com três / cinco repetições para cada tratamento (levedura) sendo que os resultados foram tabulados e analisados pelo programa SAS quanto a análise de variância (Teste F) para um nível de significância de 5%. A análise de variância foi seguida do teste de Tukey para comparação de médias, sendo adotado o nível de significância de 5% para os dois experimentos com reciclo de células (CHERUBIN, 2003).

4.4 Parâmetros Avaliados na fermentação em laboratório

4.4.1 Cálculo de rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria proporcionado pela fermentação alcoólica sendo considerado como 100% de rendimento quando ocorre a formação de 51,11g de etanol, equivalente a 64,75 ml a partir de 100. Visando a redução dos erros de medidas de volume, optou-se por determinar as pesagens dos mostos, vinhos delevedurados e biomassa celular para posterior conversão desses pesos em volumes, através de cálculo das massas com as suas respectivas densidades. Para a biomassa celular foi considerada uma densidade de 1,05 g/mL (CHERUBIN, 2003).

As análises de teores alcoólicos foram determinadas nos vinhos delevedurados. Entretanto, para os cálculos de rendimento foi necessário descontar o etanol presente na célula da levedura, assim como, o etanol proveniente da fermentação anterior. Para realizar este cálculo considera-se que o volume de

exclusão da matéria sólida da levedura (membranas e paredes celulares) representa 30,7% (v/m) da massa úmida da levedura centrifugada a 800g (CHERUBIN, 2003).

$$\text{Rendimento Fermentativo (ciclo)} = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{etanol teórico}} \times 100$$

4.4.2 Teor alcoólico no vinho

O sobrenadante dos vinhos centrifugados (25 mL) foi transferido para o interior de um microdestilador Kjeldahl e destilados por arraste em vapor, recolhendo 50ml de destilado, em balão volumétrico. As amostras destiladas foram transferidas para o densímetro digital, marca ANTON PAAR, modelo DMA 48. As densidades obtidas dos destilados foram convertidas em concentrações de etanol (% v/v) pelo aparelho e a concentração resultante no equipamento foi multiplicada por 2 para compensar a diluição ocorrida durante a destilação (Zago et al., 1996).

Teor Alcoólico % = Média dos valores obtidos pelo densímetro nas amostras dos tubos de ensaio, ponderado pelo volume de vinho total de cada tubo.

4.4.3. Determinação da viabilidade celular de levedura

As viabilidades celulares das linhagens de levedura foram determinadas através de microscopia ótica, em microscópio Nikon Eclipse e 200, considerando a leitura de células viáveis, não viáveis e brotos viáveis presentes em 160 retículos da câmara de Neubauer espelhada. Foi utilizada solução de eritrosina, em tampão citrato, como corante para distinguir as células viáveis, não coradas, das não viáveis, coradas em rósea (Oliveira *et al.*, 1996). Quando a levedura apresentou-se indiferente a eritrosina, a viabilidade foi avaliada através de microscópio de contraste de fase (GODOY *et al.*, 2009).

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Nº de células vivas de levedo do vinho bruto}}{\text{Nº de células totais de levedo do vinho bruto}} \times 100$$

4.4.4. Determinação dos açúcares residuais no vinho

Ao final das fermentações, os açúcares residuais no vinho foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo iônico DIONEX, modelo DX300, equipado com coluna Carbowack PA1 e detector baseado na amperometria de pulso com eletrodo de ouro, utilizando como fase móvel uma solução de NaOH (100 mmol.L⁻¹) sob fluxo de 1 ml.min⁻¹ (CHERUBIN, 2003).

AT % Vinho = Açúcares residuais obtidos pela cromatografia para cada tubo sendo calculado sua média (ponderado pelo volume de vinho bruto de cada tubo).

4.4.5 Velocidade da fermentação

A velocidade do processo fermentativo foi acompanhada através da pesagem dos tubos a cada hora para estimar a perda de peso causada pela eliminação do CO₂ produzido durante a fermentação. No primeiro experimento, realizado com as leveduras D1, D2 e PE2 as fermentações foram finalizadas após 9 horas enquanto que, no experimento realizado com a levedura UAM e CAT1, as fermentações foram conduzidas por até 12 horas. Essa velocidade é expressa em gramas de CO₂ perdido entre uma pesagem e outra (CHERUBIN, 2003).

4.4.6 Determinação do pH

Foram determinados em potenciômetro digital, marca DIGIMED, modelo DPH2.

4.4.7 Consumo de Ácido Sulfúrico

O consumo de ácido sulfúrico (H₂SO₄) foi determinado para cada tratamento medindo-se o volume de H₂SO₄ (1N) gasto para ajustar o pH do levedo durante o tratamento ácido (CHERUBIN, 2003). O consumo foi obtido multiplicando o volume de H₂SO₄ pela sua densidade como demonstrado na fórmula a seguir:

$$\frac{\text{volume H}_2\text{SO}_4 \text{ (mL)} \times \text{densidade (g/mL)}}{\text{volume de levedo no pé-de-cuba (L)}}$$

Consumo de H₂SO₄ (g/L =

4.4.8 Biomassa das leveduras

A produção de biomassa celular a cada ciclo fermentativo foi quantificada pela pesagem dos tubos de fermentação após a centrifugação e remoção do vinho. O valor é expresso em gramas para cada ciclo fermentativo (CHERUBIN, 2003).

4.4.9 Formação de espuma e floculação

A formação de espuma e a floculação do levedo foram avaliadas visualmente e comparadas a cada ciclo com uma levedura de referência, como é o caso da CAT1 e da PE2.

4.4.10 Avaliação da dominância e persistência das leveduras ao longo das safras

As características de dominância e persistência da levedura UAM foram avaliadas ao longo das safras pela técnica de cariotipagem como descrito por BASSO *et al.* (2008). Dominância representa a porcentagem da população representada por cada uma das leveduras identificadas pela cariotipagem, enquanto que, a persistência representa a permanência de cada levedura durante a safra (BASSO *et al.*, 1994, BASSO *et al.*, 2008 e AMORIM *et al.*, 2013).

A avaliação destas características foi realizada pela cariotipagem de amostras de levedo coletadas em diferentes momentos da safra. As leveduras foram identificadas e monitoradas pelas diferenças no número e tamanho dos cromossomos. As soluções utilizadas na cariotipagem foram:

Tampão CPES (pH 5,5):

* Ácido cítrico monohidratado	40 mM
* Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	64 mM
* EDTANa ₂ .2H ₂ O	25 mM
* Dithiothreitol	5 mM
* Sorbitol	1,24 M

Tampão CPE (pH 5,5):

* Ácido cítrico monohidratado	40 mM
* Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	64 mM
* EDTANa ₂ · 2H ₂ O	25 mM

Tampão SOL3 (pH 9,0 ajustado com NaOH 0,1 M)

* TRIS	10 mM
* SLS	1%
* EDTANa ₂ · 2H ₂ O	0,45 M

Tampão TAE (sem ajuste do pH)

* TRIS	10 mM
* Ácido acético glacial	4,3 mM
* EDTA ácido livre (anidro)	0,5 mM

Tampão TE (pH 8,0)

* TRIS	10 mM
* EDTA ácido livre (anidro)	1 mM

O preparo do DNA cromossômico intacto das leveduras e as eletroforeses foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por BASSO et al. (1994), porém com algumas modificações conforme descrito por LOPES (2000). A partir de colônias isoladas, uma fração de células foi coletada com alça metálica e depositada em cavidades de acrílico contendo 40uL de tampão CPES mais enzima de lise celular (Lising enzymes). As células foram homogeneizadas com alças metálicas e em seguida, 30 uL de agarose (60 °C) foram adicionados na cavidade para formação dos plugs de agarose. Após a solidificação da agarose os plugs foram removidos do molde e transferidos para tubos de vidro contendo 0,4 mL de tampão CPE. Após 4 horas a temperatura ambiente a solução foi removida e substituída por 0,4 mL de SOL3 contendo proteinase K (0,75 mg/mL) para a remoção de proteínas celulares. Os plugs permaneceram em banho-maria a 55 °C durante 16 horas e, ao

final deste período, foram armazenados em EDTA 0,5 M ou lavados oito vezes com TE antes de serem utilizados nas eletroforeses.

As eletroforeses em campo pulsado foram realizadas no sistema TAFE modelo Geneline (Beckmann). O gel de agarose (1,0%) foi preparado com tampão TAE sem ajuste do pH. As amostras de DNA cromossômico imobilizado em "plugs" de agarose foram aplicadas nas cavidades do gel e seladas com agarose quente. A eletroforese foi realizada com temperatura ajustada para 14 °C, durante 17 horas com pulsos de 60 s (150 mA/V) e por 1 hora com pulsos de 15 s (170 mA/V). Ao final da eletroforese, os géis foram cuidadosamente removidos da cuba e corados com brometo de etídio (0,5 ug/mL em tampão TAE) durante 1 a 3 horas. Os géis foram descorados em água destilada por uma hora e fotografados sob iluminação com luz ultravioleta.

As enzimas utilizadas neste trabalho, assim como, os reagentes Tris (hidroximetil)-aminometano (TRIS), Lauril sulfato de sódio (SLS), agarose e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos a partir da empresa Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo., USA) ou de fornecedores especializados em produtos para Biologia Molecular. Os demais produtos foram fornecidos por fabricantes locais, sendo todos com grau de pureza analítica. Todas as soluções usadas na cariotipagem foram preparadas com água desmineralizada (Sistema Milli Q plus - Millipore) e autoclavada por 20 minutos sob uma atmosfera de pressão a 120 °C. As enzimas usadas em CPES e SOL3 foram adicionadas após a autoclavagem e no momento do uso destas soluções.

4.5 Parâmetros avaliados na fermentação industrial

4.5.1 Medição do volume de etanol produzido

Utiliza-se tanque medidor de 30.000 litros aferido pelo INMETRO como padrão do volume de produção.

4.5.2 Consumo de antiespumante e dispersante

Determinado pela razão entre a medição física dos produtos aplicados na fermentação, pela produção de etanol correspondente. O resultado é expresso em gramas por litro de etanol produzido.

4.5.3 Glicerol % ART mosto

O glicerol foi determinado por cromatografia de íons no aparelho DIONEX ICS 3000 e expresso como porcentagem dos açúcares redutores totais (ART) do mosto.

4.5.4 Parâmetros avaliados nos resultados técnico e econômico

4.5.4.1 Recuperado total corrigido (RTC)

O RTC representa o rendimento industrial da Usina, levando em consideração a produção de açúcar e de álcool. O RTC minimiza os efeitos do mix de produção na eficiência. Tem a finalidade de se comparar unidades distintas em termos de relação de produção de Açúcar, Etanol.

$$\text{RTC} = \frac{(\text{Açúcar } 100\% / 0,95) + (\text{Etanol } 100 * 1000 / 0,6475 * 0,92)}{\text{Moagem} * \text{ART Cana}}$$

Açúcar 100% – Produção Total de Açúcar convertidos a 100% (em Kg).

0.95 – Conversão Açúcar em ART: 1,0 Kg açúcar Standard = 1,0495 kg de ART (Açúcares Totais Redutores), sendo assim $1/1.0495 = 0.95$.

Etanol 100% – Produção Total de Etanol convertido a 100° GL.

0.6475 – Eficiência Global: Representa a relação entre o ART que entra junto na cana e o efetivamente recuperado como etanol na base da conversão estequiométrica do ART em etanol (0,6475 litros de etanol 100% por kg de ART).

0.92 – Eficiência de fermentação e destilação utilizada como sendo a eficiência possível a ser alcançada. Na produção do etanol de cada unidade estaria embutida a sua eficiência de fermentação e destilação. Portanto se essa eficiência foi inferior a 0,92 (referência) o RTC final irá diminuir; se for igual não sofrerá influência. Essa foi uma tentativa de levar em conta a influência do mix de produção, pois a unidade que produz mais açúcar apresenta uma maior possibilidade de problemas de eficiência na fermentação. Tentou-se com esse fator 0,92 buscar uma compensação para a realização de comparação entre unidades com mix de produção muito diferentes.

4.5.4.2 Medição do volume de vinhaça em relação ao de etanol produzido

Para vinhaça é usado um medidor de vazão Krohne Conaut, modelo Optiflux KC 4000 F/6, vazão $200\text{m}^3 / \text{h}$, medida 10" instalado na Usina. Os resultados são expressos em litros de vinhaça por litro de etanol produzido como demonstrado pela fórmula:

$$\text{L vinhaça} / \text{L etanol} = \text{volume de vinhaça} / \text{volume de etanol produzido}$$

4.5.4.3 Consumo de vapor por litro de etanol

Os dados do consumo de vapor por litro de etanol produzido foram obtidos pela Fermentec através de software Hysys e foram baseados nas colunas de destilação padrão fabricados pela empresa Dedini. Os principais inputs levaram em consideração a produção de etanol absoluto, a temperatura e o teor alcoólico do vinho, número e espaçamento de bandejas, dos dispositivos de contato (valvulada, calotada e ou perfurada), diâmetro da coluna e tipo de vapor (escape e ou vegetal).

4.5.4.4 Geração de vapor por tonelada de bagaço

Especificação do fabricante de caldeiras Dedini: 1 tonelada de bagaço com 50% de umidade, produz 2,2 quilos de vapor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Monitoramentos e seleção das leveduras presentes – Safras 2007 a 2010

O processo de seleção de uma levedura começou com o acompanhamento da população de linhagens dominantes e persistentes na fermentação industrial utilizando técnicas moleculares de cariotipagem para análise do polimorfismo cromossômico. Foram necessárias 4 safras para se chegar as leveduras que receberam as denominações de: dominante 1 (D1), dominante 2 (D2) e usina alta mogiana (UAM) e Selvagem (perfis desconhecidos). As mudanças na população das leveduras dominantes durante a safra foram monitoradas pela cariotipagem. Definiu-se dominância pela porcentagem de cada levedura nas amostras analisadas pela caritipagem como determinado por Basso *et al.* (1994). Ressalta-se que a usina sempre iniciou a sua fermentação com as leveduras selecionadas PE2 e CAT1.

A Figura 3 mostra as mudanças que ocorreram na população de leveduras em 2007. O tempo 0 (zero) determina o início do processo a partir da utilização de 500Kg de PE2 (50%) e 500Kg de CAT1 (50%). Observa-se que após que 25 dias essa porcentagem passou a 70% e 30% respectivamente. Com 134 dias alcançamos 10% PE2, 35% D1, 25% D2 e 30% Selvagem. E finalmente com 187 dias a frequência de D1 e D2 chegou a 50%.

A dinâmica da população de leveduras em 2008 está demonstrada na Figura 4. O tempo 0 (zero) determina o início do processo fermentativo industrial quando foram utilizados 1.500 Kg de CAT1 (75%) e 500 Kg de PE2 (25%). Com 70 dias de safra a PE2 correspondeu a 100% das leveduras da dorna. Porém, ao longo da safra a levedura PE2 foi sendo substituída pelas leveduras selvagens D1 e D2 que reapareceram espontaneamente na fermentação. Com 245 dias de safra a população de leveduras estava representa por 70% de D2 e 30% D1. Estes resultados obtidos pelo monitoramento da população de leveduras pela técnica de cariotipagem mostram como o processo industrial está sujeito à contaminação por leveduras selvagens como descrito por Amorim *et al.* (2011).

Figura 3. Dominância das cepas de *S. cerevisiae* em dornas de fermentação por cariotipagem durante o ano de 2007.

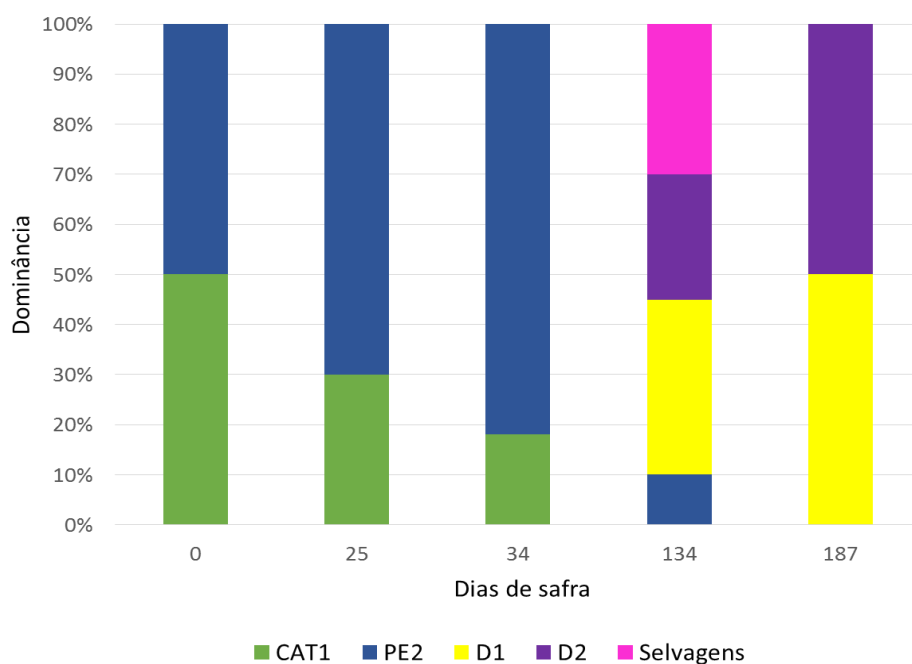
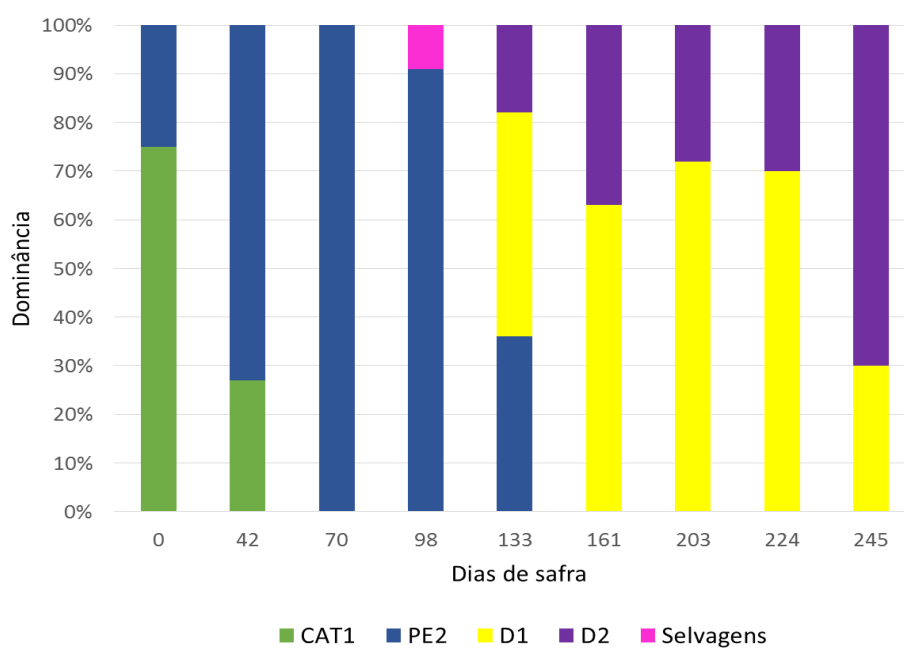


Figura 4. Dominância das cepas de *S. cerevisiae* em dornas de fermentação por cariotipagem durante o ano de 2008



A Figura 5 demonstra a dominância e sucessão das cepas de leveduras em 2009. O tempo 0 (zero) determina o início do processo fermentativo industrial quando foram utilizados 1.000 Kg de CAT1 (50%) e 1.000 Kg de PE2 (50%). Com 62 dias tivemos 95% de PE2 e 5% de D1. Com 246 dias alcançamos 10% D2, 50% Selvagem e 40% UAM. Este foi o primeiro ano em que foi observado o surgimento da levedura UAM. A levedura surgir de forma espontânea no processo fermentativo industrial como tem sido relatado em outros destilarias (AMORIM e LOPES, 2013). Por possuir um cariótipo específico, a cepa UAM pode ser identificada e monitorada pela cariotipagem ao longo da safra.

A Figura 6 mostra a dominância das leveduras na fermentação industrial em 2010 sendo que, o processo industrial de fermentação foi iniciado com 1.000 Kg de PE2 (50%) e 1.000 Kg de CAT1 (50%) como demonstrado pelo tempo 0 (zero). Com 67 dias tivemos 10% PE2 e 40% Selvagem e 50% UAM. Com 221 dias chegamos a 100% UAM.

Figura 5. Dominância das cepas de *S. cerevisiae* em dornas de fermentação por cariotipagem durante o ano de 2009.

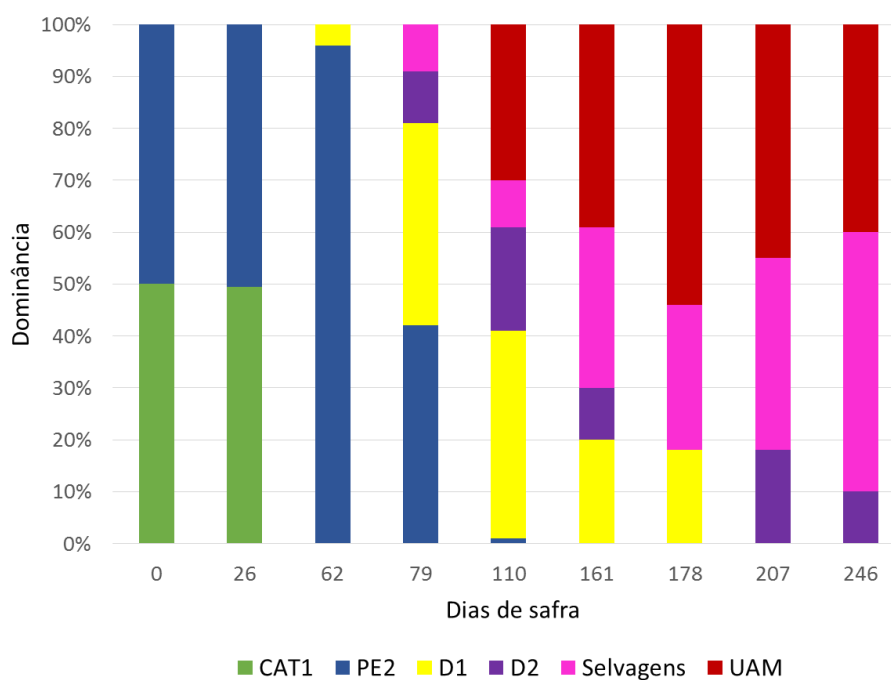
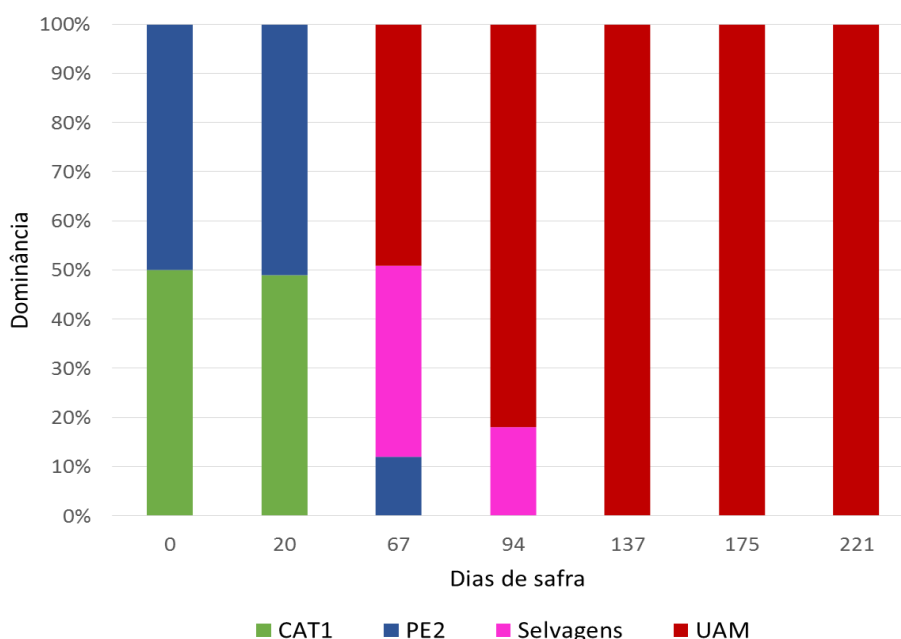


Figura 6. Dominância das cepas de *S. cerevisiae* em dornas de fermentação por cariotipagem durante o ano de 2010.



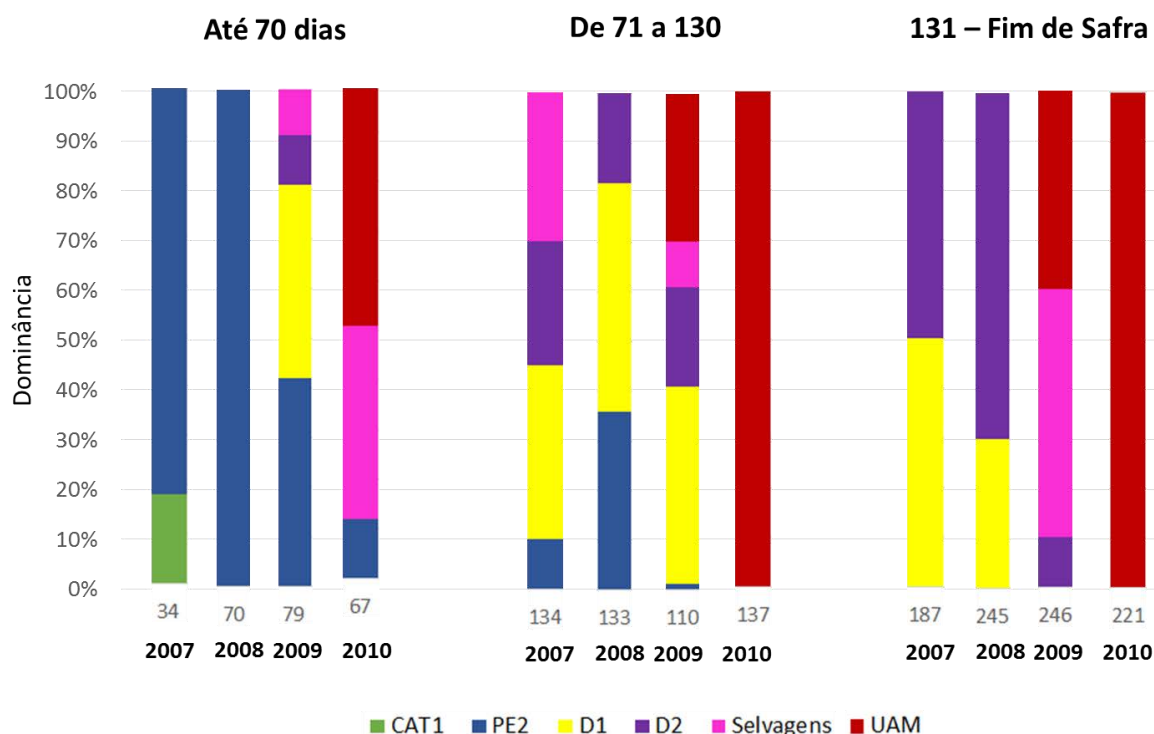
5.1.1 Resumo da cariotipagem da CAT1, PE2, D1, D2, UAM e selvagens

Os resultados de 131 dias até o fim de safra mostram a presença das leveduras D1,D2 e UAM variando a porcentagem de dominância a saber: D1 – 50% em 2007 e 30% em 2008; D2 – 50% em 2007, 70% em 2008 e 10% em 2009; UAM – 40% em 2009 e 100% em 2010. Decidiu-se estudar as linhagens D1,D2 e UAM.

A característica de dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais foi demonstrada pela cariotipagem no início da década de 1990. (BASSO *et al.*, 1993). Estes pesquisadores observaram que as linhagens de leveduras introduzidas no processo industrial de fermentação alcoólica eram substituídas por leveduras contaminantes com cariótipos distintos das linhagens iniciais.

Essa sucessão de leveduras podia ser observada ao longo da safra para diferentes usinas, assim como, para diferentes linhagens de leveduras. Dentre as leveduras que eram substituídas mais rapidamente estavam as linhagens de panificação (AMORIM *et al.*, 2004).

Figura 7. Dominância das leveduras D1,D2 e UAM nas safras 2007 a 2010, considerando intervalos de 0-70, 71-30 e 131-238 dias.



Para fazer a identificação e o monitoramento das leveduras pela cariotipagem os perfis de cromossomos eram comparados com os perfis de leveduras de referência. Num primeiro momento, a cariotipagem permitiu monitorar a sucessão de leveduras durante a safra mas, rapidamente também passou a ser utilizada para a seleção de novas linhagens de leveduras que apresentavam dominância sobre outras linhagens e persistiam na fermentação ao longo da safra (AMORIM e LEÃO, 2005).

Apesar de muitas leveduras apresentarem características de dominância e persistência nas fermentações industriais, nem todas as linhagens reúnem habilidades fermentativas importantes para a indústria (BASSO *et al.*, 2008). Em geral, estas leveduras contaminantes apresentam a formação de espumas em excesso, floculação e sobra de açúcar residual no vinho prejudicando o rendimento da fermentação (AMORIM *et al.*, 2011).

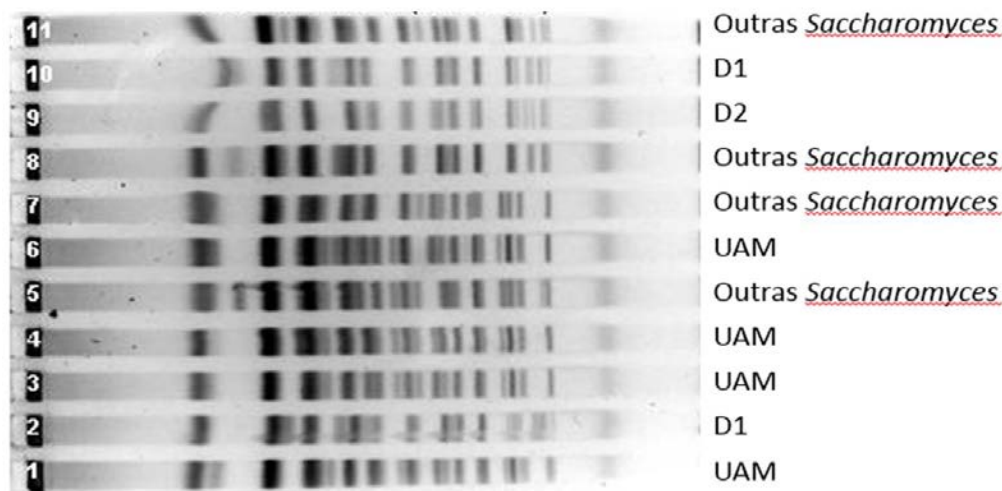
De acordo com Basso *et al.*, (2008) apenas 20% das leveduras contaminantes não apresentaram características negativas, ou seja, a maioria das

leveduras que contaminam fermentações industriais não são interessantes para a indústria. Por essa razão, apenas o monitoramento e a seleção de leveduras dominantes e persistentes não é garantia de se obter uma boa linhagem industrial. É necessário avaliar o desempenho da levedura em condições de fermentação e compará-la com linhagens de referência.

5.2 Monitoramento e avaliação das leveduras D1, D2 e UAM

Na Figura 8 é apresentado o resultado de cariotipagem de uma das amostras analisadas durante a safra de 2009 em que estão presentes as leveduras D1, D2, UAM e outras linhagens contaminantes identificadas pela cariotipagem.

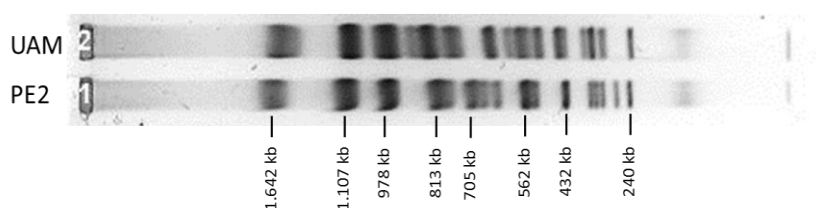
Figura 8. Cariotipagem e identificação de leveduras contaminantes do processo industrial de fermentação alcoólica da Usina Alta Mogiana identificadas pelos perfis cromossômicos de 1 a 11 em Linhagens D1, D2, UAM e outras *Saccharomyces*. Amostra coletada em 01/09/2009 aos 151 dias de fermentação.



A Figura 9 mostra as diferenças no cariótipo entre as leveduras PE2 (referência) e a levedura UAM. Os tamanhos dos cromossomos na levedura PE2 foram obtidos a partir da sua caracterização por Lopes (2000). Estas diferenças no tamanho e número de cromossomos permitiu identificar a UAM, fazer seu monitoramento e seleção. Estes resultados estão em concordância com o trabalho

apresentado por Amorim e Lopes (2013) sobre a dominância e seleção de leveduras industriais.

Figura 9. Perfil eletroforético dos cromossomos da levedura UAM separados pelo sistema TAFE. A linhagem PE2 foi utilizada como padrão para a estimativa do tamanho e número das bandas de DNA cromossômico da levedura UAM. As bandas assinaladas na PE2 são aquelas com maior estabilidade como demonstrado por Lopes (2000). Kb = kilobases. Amostra coletada 26/05/2011.



O monitoramento pela cariotipagem permitiu determinar quais leveduras contaminaram a fermentação industrial da Usina Alta Mogiana e se estas leveduras apresentavam dominância na população e persistência no processo ao longo das safras. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram isolar três cepas de leveduras: D1, D2 e posteriormente a UAM. Estas leveduras foram então submetidas a testes em escala de laboratório para avaliar características de importância para a indústria o que compreendeu a análise de 11 parâmetros, comparativos entre D1 e D2 x PE2 e UAM x CAT1. São eles: floculação, espuma, teor alcoólico, viabilidade celular, açúcares residuais, biomassa, glicerol, rendimento fermentativo, pH e consumo de ácido e finalmente velocidade da fermentação.

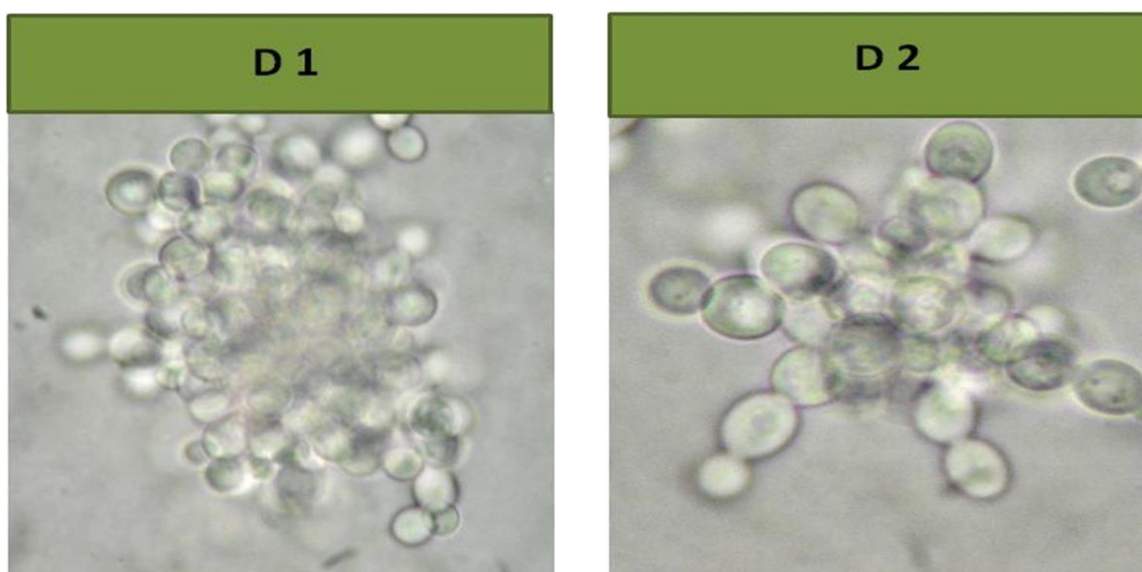
5.2.1 Floculação e Espuma

5.2.1.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

Dentre as primeiras características avaliadas estavam a floculação das células e a formação de espuma. As leveduras D1 e D2 foram avaliadas durante cinco ciclos sucessivos de fermentação, sendo o mesmo procedimento feito com a

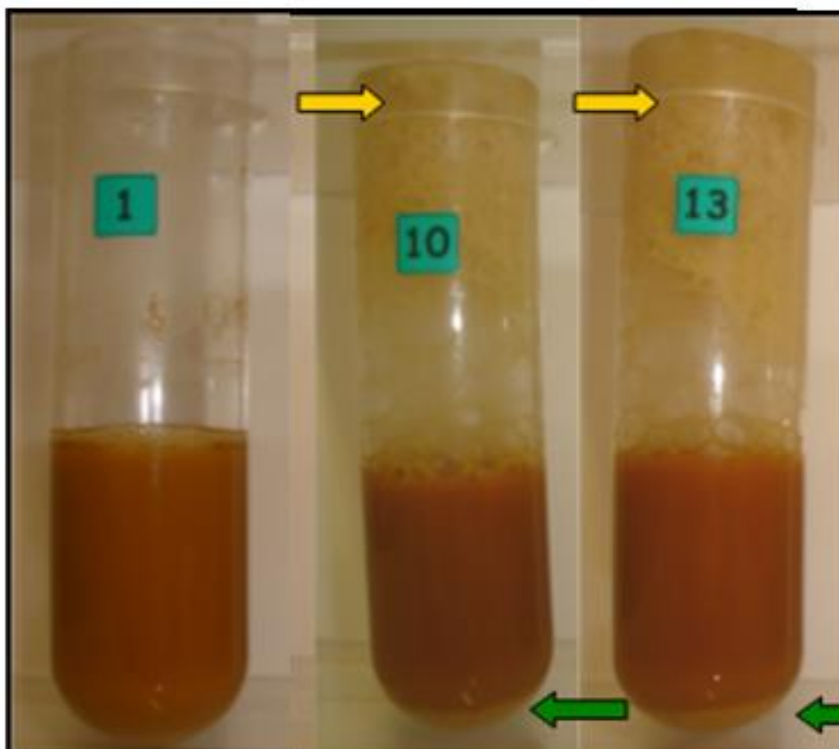
selecionada PE2, uma levedura não flocula por si própria. Os resultados obtidos por microscopia óptica mostraram que as leveduras D1 e D2 apresentavam células formando flocos grandes como demonstrado na Figura 10. Conforme demonstrado por Amorim e Leão (2005), a floculação é uma característica relacionada com a cepa de levedura e com a contaminação bacteriana. Muitas cepas de leveduras que contaminam as fermentações industriais apresentam características floculantes o que prejudica o desempenho da fermentação. Estes resultados também estão consistentes com as observações realizadas por Amorim e Lopes (2013) sobre os prejuízos causados pelas leveduras floculantes.

Figura 10. Morfologia celular das leveduras contaminantes D1 e D2 selecionadas na fermentação industrial da Usina Alta Mogiana. As duas leveduras apresentaram a formação de flocos grandes ou aglomerados de células.



As células floculadas não apresentam uma boa dispersão no meio da fermentação, sedimentaram rapidamente e impedem a utilização eficiente e rápida dos açúcares do mosto pela levedura. Elas também promoveram muito mais espuma quando comparado a PE2 (Figura 11).

Figura 11. Leveduras PE2 (tubo 1), D1 (tubo 10), e D2 (tubo 13), em 1 hora de fermentação, após a 1ª alimentação. As setas amarelas indicam as espumas e as verdes as sedimentações das leveduras D1 e D2 por causa da característica de floculação.



5.2.1.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

A Figura 12 mostra que não ocorreu floculação nas duas linhagens CAT1 e UAM. Também mostra que a linhagem UAM formou mais espuma que a CAT1. Teste complementares para floculação e formação de espumas, realizados após 2,5 horas confirmaram as observações iniciais como demonstrado na Figura 12 e 13.

O volume de espuma formado pela linhagem CAT1 manteve-se em torno de 50 mL na proveta durante as 5 horas de fermentação. Porém, o volume de espuma formado pela linhagem UAM variou na média de 40 a 350 mL na proveta. Sendo que a altura máxima da espuma da linhagem UAM alcançou volume de 347 mL na proveta (Figura 14).

Figura 12. Ensaio de floculação após 15 minutos a temperatura ambiente: (1) CAT-1 e (2 a 4) UAM.



Figura 13. Formação de espuma das linhagens CAT1 (provetas 1, 2 e 3) e UAM (provetas 4, 5 e 6) após 2,5 h de fermentação a 33°C.

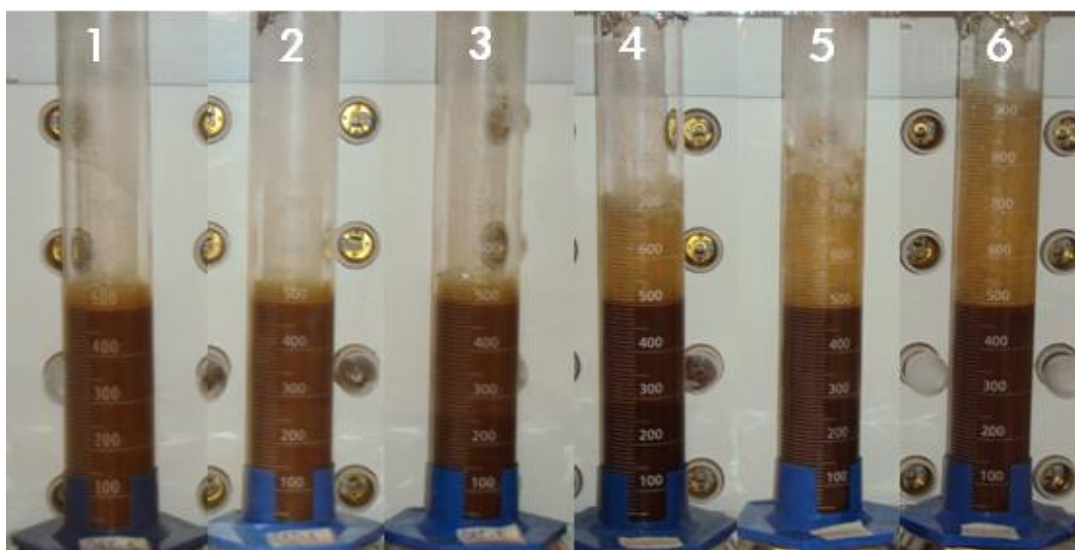
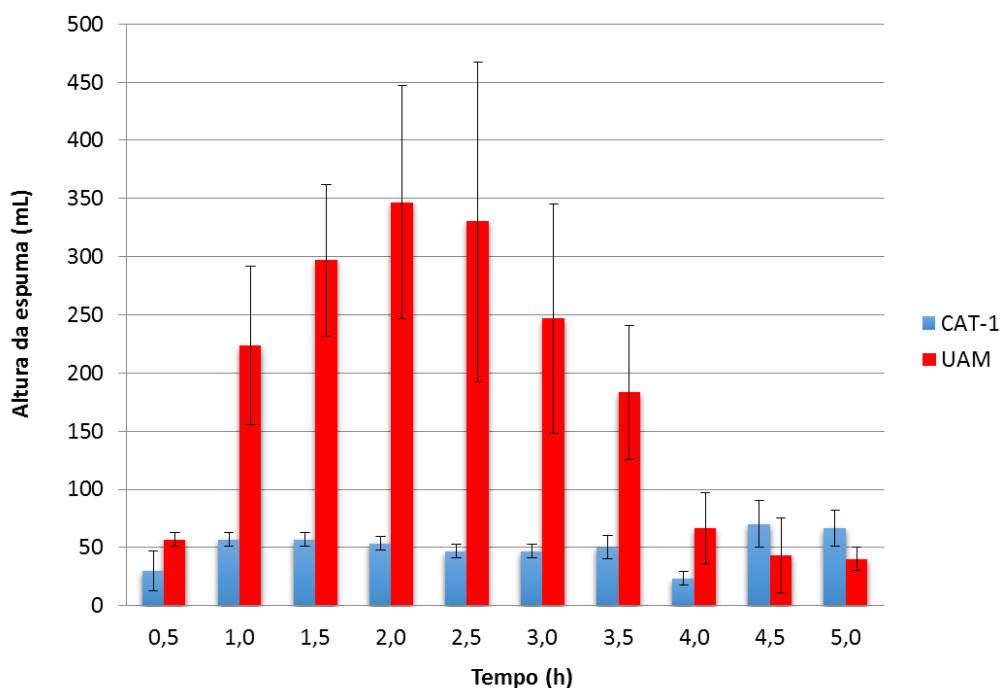


Figura 14 - Formação de espuma das leveduras CAT1 e UAM durante 5 horas de fermentação a 33°C



5.2.1.3 Avaliação da floculação e espuma da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Em resumo, as avaliações permitiram demonstrar que a linhagem UAM não apresentava problemas de floculação como observado para as leveduras D1 e D2. Por outro lado, a levedura UAM se mostrou formadora de espumas (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da floculação e espuma pelas cepas D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Parâmetros avaliados	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
Floculação	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Espuma	Muita espuma	Muita espuma	Pouca espuma	Muita espuma	Pouca espuma

5.2.2 Teor Alcoólico

5.2.2.1 – Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

Quanto ao teor alcoólico na fermentação, as leveduras D1 e D2 produziram menos álcool em relação à levedura PE2. Esta diferença foi observada no terceiro ciclo fermentativo (Figura 15) quando as linhagens D1 e D2 flocularam, apresentaram redução da viabilidade celular e sobra de açúcares residuais no vinho. Além disso, as leveduras D1 e D2 converteram, no 3º ciclo, mais açúcar em glicerol (Figura 23) do que em etanol, o que prejudicou o rendimento fermentativo (Figura 25) neste ciclo, juntamente com a sobra de açúcares no vinho (Figura 19) .

A cada ciclo fermentativo aumentou-se a concentração de açúcares na alimentação (mosto) para se obter maiores teores de etanol de um ciclo para o outro. Este aumento na concentração alcoólica da fermentação foi realizada com a finalidade de avaliar a tolerância das leveduras ao etanol. Do ponto de vista prático está característica era de especial importância para a Usina Alta Mogiana, uma vez que havia dificuldade para se trabalhar com teores mais elevados de álcool no vinho. De acordo com Amorim e Lopes (2013), as fermentações alcoólicas industriais no país tem trabalhado com concentrações de 8 a 8,5% de álcool.

Neste experimento, os teores de etanol no 1º ciclo variaram de 7,84 a 8,13% (Tabela 4), independentemente da levedura sendo ligeiramente superior para as leveduras D1 e D2 (Figura 15). No segundo ciclo, o teor alcoólico variou entre 9,28% a 9,71% sendo ligeiramente inferior para a levedura PE2. Porém, no terceiro ciclo o teor alcoólico ultrapassou 10% para a levedura PE2 mas manteve-se abaixo de 10% para as leveduras D1 e D2.

Figura 15 - Teor de etanol nos vinhos de levedurados das leveduras PE2, D1 e D2, durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

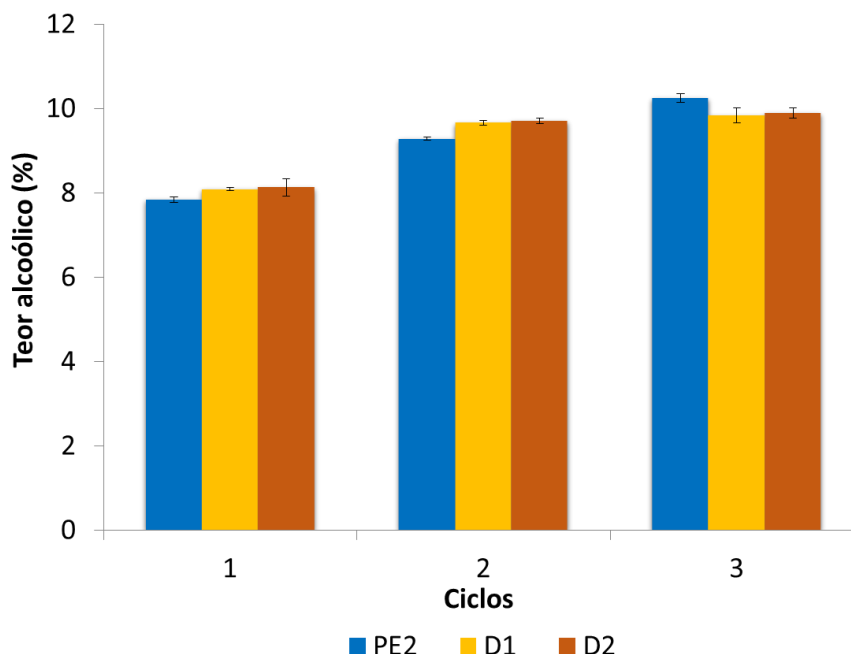


Tabela 4 - Teor de etanol nos vinhos de levedurados das leveduras PE2, D1 e D2, durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	Etanol (% v/v)			Média geral (ciclos 1 a 3)
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	
PE2	7.76	9.28	10.24	
	7.90	9.24	10.36	
	7.86	9.32	10.14	
MÉDIA	7.84	9.28	10.25	9.12
D1	8.14	9.32	10.18	
	8.08	9.64	10.02	
	8.12	9.62	9.66	
	8.05	9.72	9.82	
MÉDIA	8.08	9.66	9.83	9.19
D2	8.28	9.74	9.76	
	8.20	9.64	9.92	
	7.90	9.74	10.00	
MÉDIA	8.13	9.71	9.89	9.24

5.2.2.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

Comparando os teores alcoólicos das fermentações realizadas em escala de laboratório constatamos que a levedura UAM foi a cepa que apresentou maior teor alcoólico em relação a CAT1 (Figura 16 e Tabela 5). Estes teores alcoólicos obtidos pela levedura UAM também foram superiores ao observado para as leveduras D1 e D2. Essa habilidade de tolerar teores alcoólicos mais elevados é considerada fundamental por influenciar diretamente no consumo de vapor do processo uma vez que aumentando o teor alcoólico se reduz o consumo de vapor. Além disso, a economia de vapor também está aliada à redução da geração de vinhaça. O número 10% é uma meta que as usinas buscam alcançar como média para safra. Segundo pesquisa anual Fermentec somente 7 de 62 unidades conseguiram essa meta na safra 2014. Dentre as leveduras avaliadas somente a PE2, CAT1 e UAM conseguiram ultrapassar esta meta como demonstrado na Tabela 6.

Figura 16. Teor de etanol nos vinhos de levedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições.

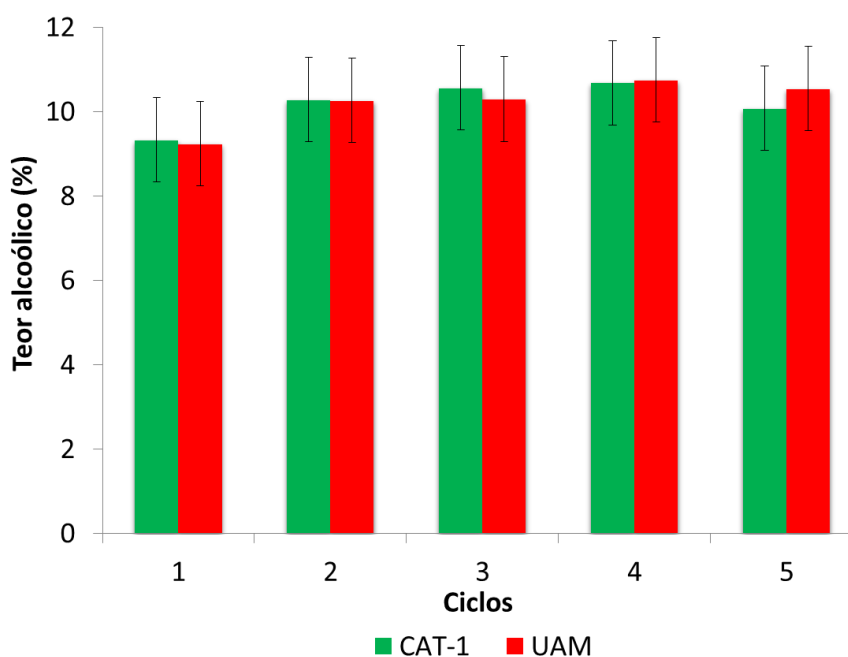


Tabela 5. Teor de etanol nos vinhos de levedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Levedura	Etanol (g/100 mL)					Média geral (ciclos 1 a 5)
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
AT1	9.28	10.3	10.2	10.8	10.2	
	9.34	10.3	10.7	10.5	9.8	
	9.34	10.2	10.7	10.8	10.2	
	9.34	10.4	10.7	10.6	10.0	
MÉDIA	9.3	10.3	10.6	10.7	10.1	10.2
UAM	9.30	10.3	10.6	10.8	10.8	
	9.16	10.2	10.1	10.8	10.8	
	9.28	10.3	10.3	10.8	10.6	
	9.22	10.3	10.2	10.6	10.0	
MÉDIA	9.2	10.3	10.3	10.8	10.5	10.2

O teor alcoólico alcançado pela levedura UAM no ciclo 5 mostrou-se 3,9% maior que o da CAT1. Essa característica demonstra maior produção de etanol, além da tolerância a permanecer nesse ambiente sem prejudicar sua viabilidade e produção de biomassa.

5.2.2.3 Avaliação do teor alcoólico da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Na Tabela 6 está demonstrado o teor alcoólico obtido no último ciclo fermentativo para cada uma das leveduras avaliadas. As leveduras PE2, D1 e D2 foram avaliadas durante três ciclos fermentativos enquanto que CAT1 e UAM foram avaliadas por cinco ciclos fermentativos para confirmação dos resultados.

Tabela 6. Avaliação do teor alcoólico da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Parâmetro avaliado	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
Teor alcoólico (% v/v)	9,83	9,89	10,25	10,50	10,10
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	<10	<10	>10	>10	>10

5.2.3 Viabilidade celular das leveduras

5.2.3.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

Os resultados de viabilidade das leveduras encontram-se na Figura 17 e Tabela 7. A viabilidade da PE2, manteve-se acima de 90% em todos os ciclos, já a viabilidade da D1 e D2 reduziu, em média, 12% do 1º para o 2º ciclo e continuou a reduzir do 2º para o 3º ciclo, ficando em valores abaixo de 80% de viabilidade para as duas leveduras. A PE2 foi a levedura que manteve a maior viabilidade (98,2%) ao final do 3º ciclo, diferindo-se estatisticamente das demais, D1=78,8% e D2=76,2%) (Figura 17 e Tabela 7). A redução de viabilidade pode ser característica genética destas variantes.

Figura 17. Viabilidade das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições.

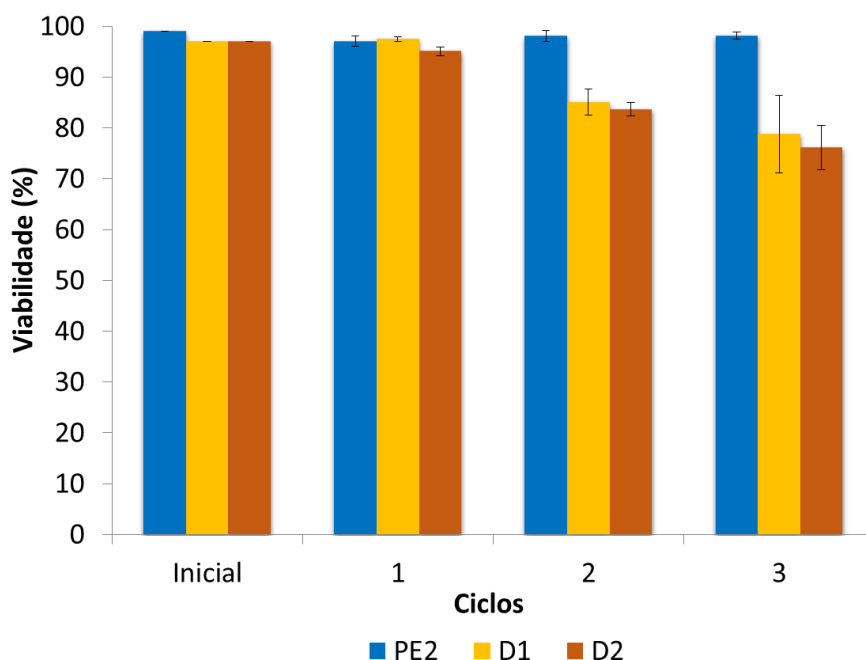


Tabela 7. Viabilidade das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	Viabilidade (%)				Média geral (Ciclos 1 a 3)
	Viabilidade inicial	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	
PE2	99.0	98.1	98.8	98.7	
	99.0	97.2	96.9	97.4	
	99.0	96.0	98.6	98.4	
MÉDIA	99.0	97.1	98.1	98.2	97,8
D1	97.0	97.0	85.9	86.3	
	97.0	98.0	82.2	71.1	
	97.0	97.4	87.2	78.9	
MÉDIA	97.0	97.5	85.1	78.8	87,1
D2	97.0	96.0	83.4	80.7	
	97.0	95.0	85.2	76.0	
	97.0	94.3	82.5	72.0	
MÉDIA	97.0	95.1	83.7	76.2	85,0

5.2.3.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

Os resultados de viabilidade das leveduras encontram-se na Figura 18 e Tabela 8. As duas leveduras terminaram o 5º ciclo com as mesmas viabilidades, 74,8% a UAM e 74,7% a CAT1.

As viabilidades a partir do 3º ciclo foram avaliadas através do microscópio de contraste de fase, portanto os valores obtidos no 2º ciclo podem estar subestimados para a UAM por terem sido analisados com eritrosina, visto que os demais parâmetros desta levedura não podiam ser justificados com uma viabilidade de 62,5%, obtida no 2º ciclo por coloração diferencial. Estas diferenças nas viabilidades devem-se às características intrínsecas desta levedura, UAM, que pode ser “indiferente” à eritrosina.

Figura 18. Viabilidade das leveduras CAT1 e UAM1, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

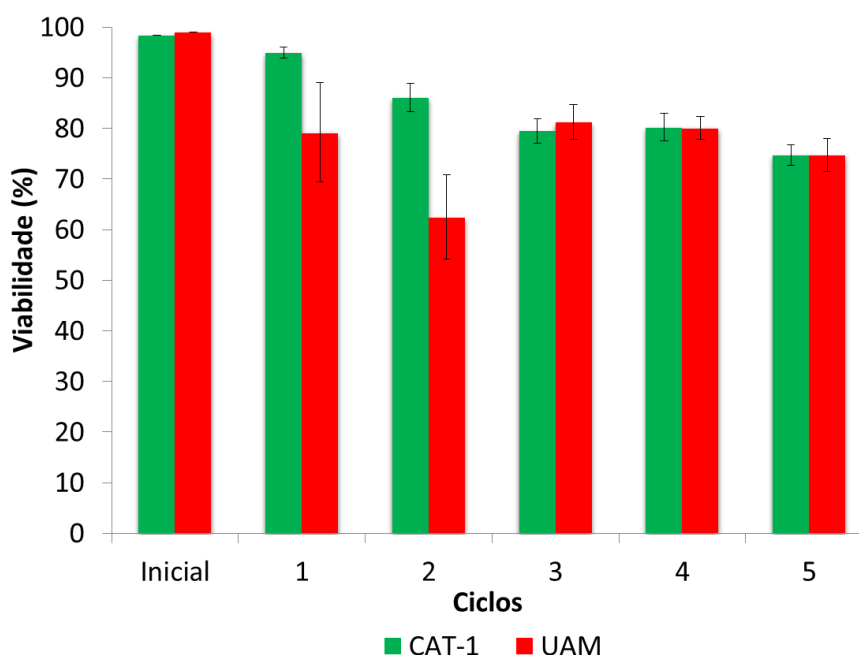


Tabela 8. Viabilidade das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Leveduras	Viabilidade (%)						Média geral (ciclos 1 a 5)
	Viabilidade Inicial	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	98.4	96.0	89.1	77.0	83.1	73.7	
	98.4	93.5	83.6	82.8	78.2	73.1	
	98.4	95.1	83.9	78.9	77.7	77.6	
	98.4	95.3	87.8	79.4	82.1	74.4	
MÉDIA	98.4	95.0	86.1	79.5	80.3	74.7	83.1
UAM	99.0	77.9	59.7	83.1	82.5	76.9	
	99.0	85.4	51.9	85.1	81.4	76.6	
	99.0	65.9	68.4	78.6	78.6	75.6	
	99.0	87.6	69.9	78.2	77.9	69.9	
MÉDIA	99.0	79.2	62.5	81.3	80.1	74.8	75.6

5.2.3.3 Avaliação da viabilidade celular da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Os resultados foram prejudicados pela utilização dos 2 métodos eritrosina e microscópio; ressalta-se aqui sempre a diferença entre as cepas pesquisadas e o padrão. No caso da D1 e D2 tivemos mais de 10% de diferença em relação a PE2 uma queda expressiva. Já a UAM a partir do ciclo que utilizou-se o microscópio de contraste de fase (3º ciclo), praticamente não apresentou diferença em relação a CAT1 do 3º ao 5º ciclos sendo obtido uma viabilidade média de 78,17% para CAT1 e para a UAM média de 78,73% (Tabela 9).

Tabela 9. Viabilidade das leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 em experimentos com ciclos fermentativos

Parâmetro avaliado	Experimento 1			Experimento 2	
	D1 3 ciclos	D2 3 ciclos	PE2 3 ciclos	UAM 3º ao 5º ciclo	CAT1 3º ao 5º ciclo
Viabilidade	87,1	85,0	97,8	78,73	78,17
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Reduzido	Reduzido	Normal	Normal	Normal

5.2.4. Açúcares residuais das leveduras

5.2.4.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

Os açúcares residuais nos vinhos, após 9h de fermentação, ficaram semelhantes entre as leveduras no 1º e 2º ciclo, em que os teores alcoólicos estavam entre 7 e 9%, porém no 3º ciclo as leveduras D1 e D2 deixaram 3 vezes mais açúcares em seus vinhos (0,925 e 0,895g/100mL) quando comparadas com os vinhos das leveduras PE2 (0,143 g/100mL). O teor de açúcar do mosto foi aumentado para se chegar a uma fermentação com teor alcoólico acima de 10% como demonstrado anteriormente (Figura 15). A redução da viabilidade das leveduras D1 e D2, pode ter contribuído para a sobra de açúcares nos vinhos (Figura 19 e Tabela 10). A sobra de açúcares no vinho (sem fermentar) causada pela contaminação por leveduras selvagens é um dos principais desafios na fermentação industrial (AMORIM et al., 2011).

Figura 19. Açúcares residuais nos vinhos delevedurados das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições.

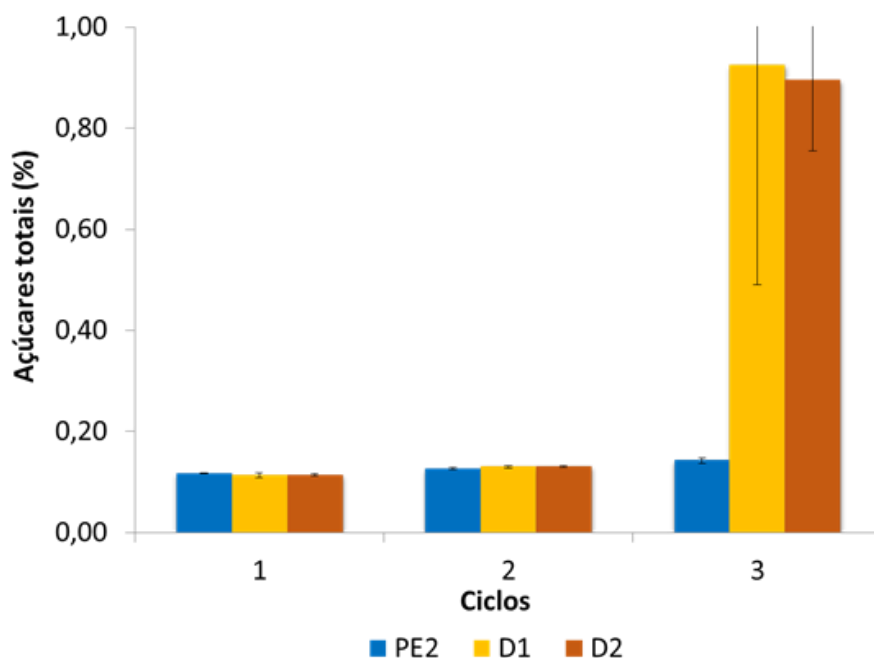


Tabela 10. Açúcares residuais nos vinhos delevedurados das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	Açúcares residuais nos vinhos delevedurados (g/100mL)			
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	Média geral (ciclos 1 a 3)
PE2	0.118	0.124	0.148	
	0.117	0.127	0.137	
	0.116	0.128	0.143	
MÉDIA	0.117	0.126	0.143	0.129
D1	0.119	0.129	0.503	
	0.109	0.133	1.370	
	0.114	0.129	0.901	
MÉDIA	0.114	0.130	0.925	0.390
D2	0.116	0.133	1.020	
	0.113	0.131	0.745	
	0.113	0.129	0.922	
MÉDIA	0.114	0.131	0.895	0.380

5.2.4.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

Os açúcares residuais nos vinhos foram totalmente consumidos nos 1º, 2º, 3º e 4º ciclos para a levedura UAM 1 e CAT1, já no 5º ciclo ambas as leveduras deixaram açúcares residuais nos vinhos nas concentrações médias de 0,185g/100mL para a UAM e 0,294g/100mL para a CAT1 (Figura 20 e Tabela 11).

Além disso, é importante ressaltar que as leveduras D1 e D2 já haviam deixado açúcares residuais no vinho logo no terceiro ciclo fermentativo e em concentrações muito mais elevadas. Esta sobra de açúcares no vinho afeta o desempenho da fermentação como descrito por Basso *et al.* (2008) e Amorim *et al.* (2011).

Figura 20. Açúcares residuais nos vinhos de levedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

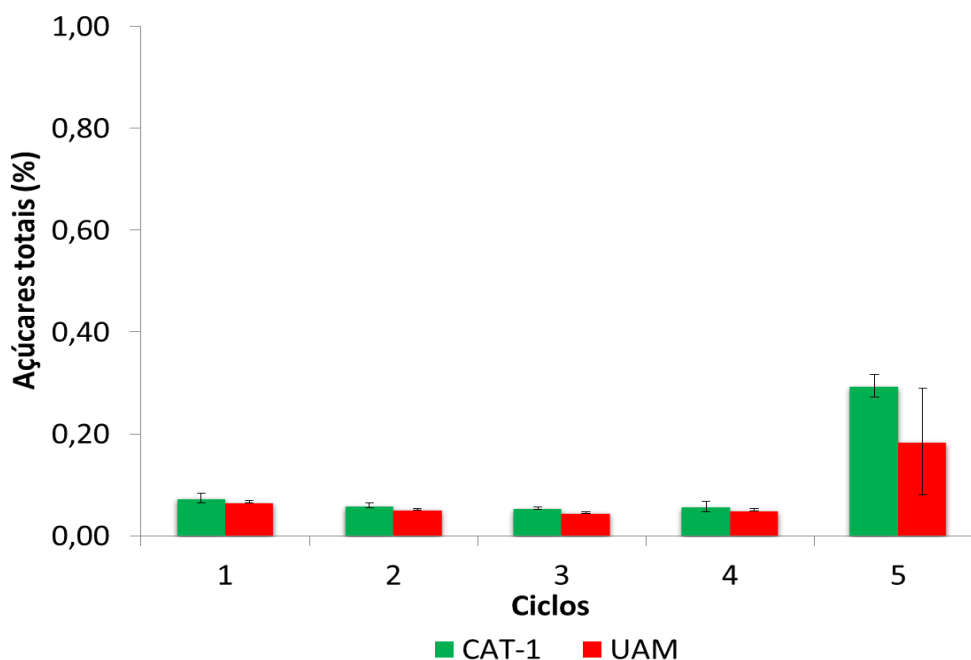


Tabela 11. Açúcares residuais nos vinhos delevedurados das leveduras CAT1 e UAM durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Levedura	Açúcares residuais nos vinhos delevedurados (g/100mL)					Média geral (Ciclos 1 a 5)
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	0.070	0.058	0.056	0.071	0.264	
	0.082	0.066	0.051	0.058	0.293	
	0.063	0.055	0.056	0.048	0.313	
	0.083	0.059	0.055	0.053	0.307	
MÉDIA	0.074	0.060	0.055	0.057	0.294	0.108
UAM	0.067	0.053	0.044	0.050	0.156	
	0.068	0.055	0.046	0.054	0.071	
	0.068	0.052	0.045	0.049	0.192	
	0.063	0.051	0.048	0.050	0.322	
MÉDIA	0.067	0.053	0.046	0.051	0.185	0.080

Nesse parâmetro ficou evidente a concentração de açúcares não fermentados ao final do processo pela D1 e D2 (Tabela 12). Para reduzir estas perdas seriam necessárias mais dornas instaladas, pois o tempo de fermentação aumentaria para se alcançar o número considerado bom (< 0,15%) de açúcares. Já a UAM apresentou o menor índice demonstrando ser a melhor levedura nesse quesito.

Tabela 12. Avaliação da concentração dos açúcares residuais nos vinhos delevedurados da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Parâmetro avaliado	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
Açúcares residuais no vinho delevedurado (%)	0,390	0,380	0,129	0,080	0,108
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Alto	Alto	Baixo	Baixo	Baixo

5.2.5 Biomassa de leveduras formada durante ciclos fermentativos

5.2.5.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

No início do 1º ciclo as biomassas foram ajustadas em 8,8 g para cada tubo. Antes de iniciar cada ciclo as biomassas de todos os tubos eram ajustadas para o mesmo valor. De maneira geral, houve formação significativa de biomassa celular durante o primeiro ciclo fermentativo para as leveduras PE2. As leveduras D1 e D2, por serem espumantes, acabaram perdendo biomassa na primeira hora de fermentação do primeiro ciclo (Figura 21 e Tabela 13). Com a aplicação de antiespumante, ainda no primeiro ciclo, foi possível avaliar as biomassas formadas nos demais ciclos.

Figura 21 - Biomassa celular úmida das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

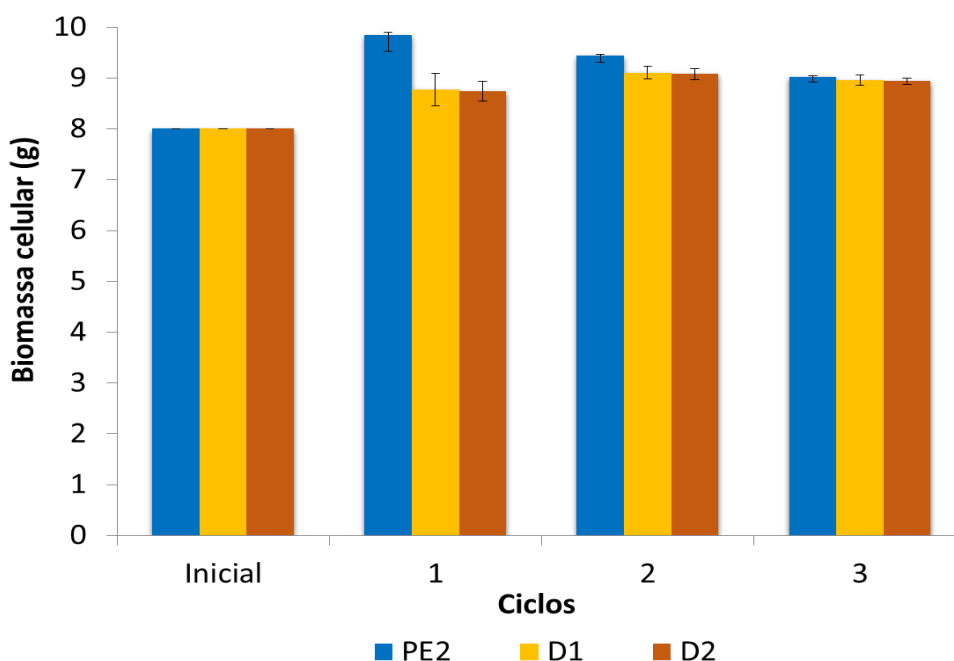


Tabela 13. Biomassa celular úmida das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9 horas de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	Biomassa celular úmida (g)			
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	Média geral (Ciclo 1 a 3)
PE2	9.80	9.44	9.03	
	9.91	9.46	9.00	
	9.82	9.42	9.04	
MÉDIA	9.84	9.44	9.02	9.44
D1	8.44	8.97	9.07	
	9.07	9.13	8.88	
	8.81	9.21	8.92	
MÉDIA	8.77	9.10	8.96	8.94
D2	8.52	8.98	8.98	
	8.86	9.19	8.87	
	8.84	9.07	8.97	
MÉDIA	8.74	9.08	8.94	8.92

5.2.5.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

No início de cada ciclo as biomassas das leveduras foram ajustadas em 8,8 g para cada tubo. As biomassas formadas foram maiores no primeiro ciclo fermentativo porque neste ciclo não houve tratamento ácido do fermento, portanto as leveduras não estavam em situação de estresse devido ao ácido sulfúrico (Figura 22 e Tabela 14).

A partir do segundo ciclo, com o tratamento do fermento, a CAT1 passou a formar menos biomassa que a UAM, o que pode indicar maior capacidade de sobrevivência da UAM, que manteve constante a formação de novas células para as condições desta fermentação. A CAT-1 diminuiu a formação de biomassa a cada ciclo.

O fato de haver sobra de açúcar no quinto ciclo, pela CAT1 (Figura 20), foi devido a menor velocidade de fermentação desta levedura, correlacionada, principalmente, pela diminuição da biomassa, como mostra a Figura 22, sendo assim, o tempo de fermentação (12h e 30 min) não foi suficiente para o término da fermentação.

Figura 22. Biomassa celular úmida das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

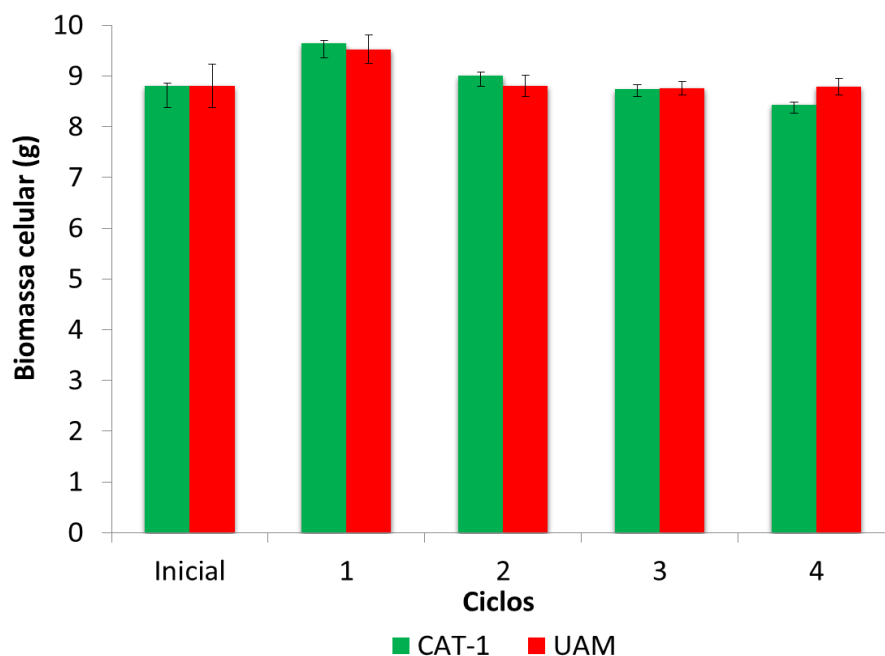


Tabela 14. Biomassa celular úmida das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Levedura	Biomassa celular úmida (g)					Média geral (ciclos 1 a 5)
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	9.59	8.99	8.83	8.48	8.16	8.80
	9.58	8.94	8.75	8.36	8.26	
	9.72	9.10	8.71	8.54	8.27	
	9.65	8.97	8.64	8.35	8.20	
MÉDIA	9.64	9.00	8.73	8.43	8.22	8.80
UAM	9.04	8.57	8.55	8.61	8.80	8.91
	9.92	9.05	8.96	8.95	8.83	
	9.29	8.55	8.62	8.79	8.64	
	9.85	9.05	8.90	8.79	8.48	
MÉDIA	9.53	8.81	8.76	8.79	8.69	8.91

5.2.5.3 Avaliação da viabilidade celular da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Com relação a formação de biomassa, na média geral, os resultados foram semelhantes para D1 e D2 mas a levedura PE2 se destacou por ter formado mais biomassa (Tabela 15). Apesar de não haver diferenças expressivas entre as leveduras UAM e CAT1 na media geral, é importante ressaltar que a UAM conseguiu manter uma formação constante de biomassa ao longo dos ciclos fermentativos enquanto que a CAT1 apresentou um decréscimo a cada ciclo.

Tabela 15. Avaliação da biomassa celular das Leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Parâmetro avaliado	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
Biomassa celular (g)	8,94	8,92	9,44	8,91	8,80
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

5.2.6 Produção de Glicerol

5.2.6.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

A produção de glicerol variou de 0,247 a 0,493 g/100mL nos diferentes tubos (Figura 23 e Tabela 16). No 1º e 2º ciclo fermentativo as taxas de formação de glicerol foram praticamente iguais entre as leveduras, porém ao final do 3º ciclo as leveduras da Alta Mogiana formaram 1,4 vezes mais glicerol que a levedura PE2.

Como não observamos crescimento significativo da levedura, ou seja, formação de biomassa, e a contaminação bacteriana ficou controlada até ($<1 \times 10^5$ bastonetes/mL) então algum outro fator estressante pode ter favorecido a formação do glicerol, como o aumento da concentração de açúcares na alimentação, e consequente aumento de teor de etanol e queda de viabilidade.

As leveduras D1 e D2 converteram, no 3º ciclo, mais açúcar em glicerol do que em etanol, o que prejudicou o rendimento fermentativo neste ciclo, juntamente com a sobra de açúcares no vinho.

Figura 23 - Formação de glicerol nos vinhos de levedurados das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

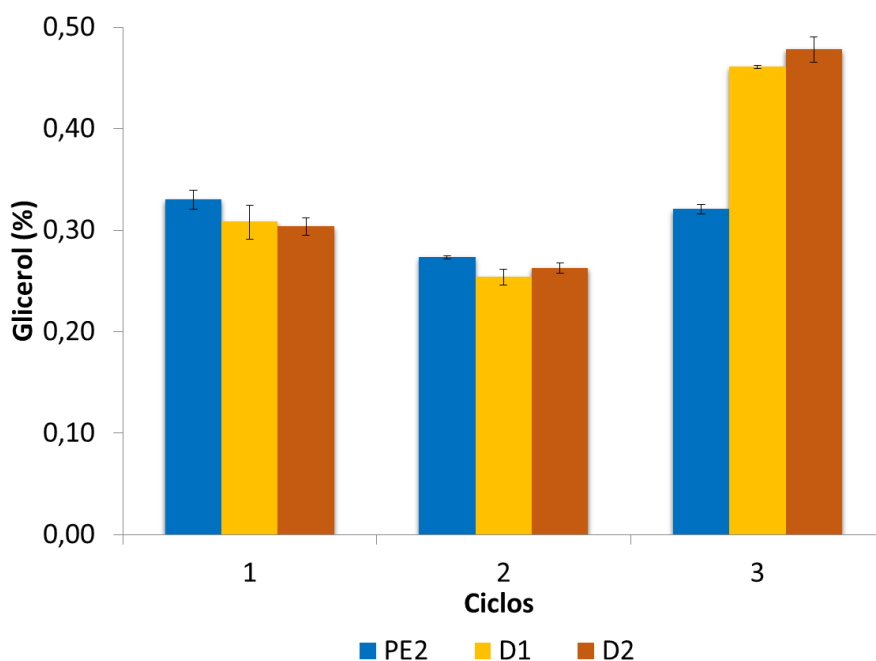


Tabela 16 - Formação de glicerol nos vinhos de levedurados das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	Glicerol (g/100mL)			Média geral (Ciclos 1 a 3)
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	
PE2	0.334	0.273	0.320	
	0.337	0.272	0.326	
	0.320	0.275	0.316	
MÉDIA	0.330	0.273	0.321	0.31
D1	0.327	0.263	0.462	
	0.303	0.252	0.459	
	0.295	0.247	0.461	
MÉDIA	0.308	0.254	0.461	0.34
D2	0.312	0.268	0.472	
	0.305	0.263	0.493	
	0.294	0.258	0.470	
MÉDIA	0.303	0.263	0.478	0.35

5.2.6.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

A produção de glicerol variou de 0,233 a 0,406 g/100 mL de vinho nos diferentes tubos (Figura 24 e Tabela 17) e estes valores estão dentro da faixa comumente encontrada em ensaios de fermentação em mosto de melaço. As taxas de formação de glicerol para a UAM (0,345g/100mL) foram maiores do que a da CAT1 (0,287g/100mL), apresentando diferenças significativas entre as médias de todos os ciclos. O fato da UAM formar mais biomassa que a CAT1 (ciclos 3 a 5) pode justificar a maior produção de glicerol pela UAM como demonstrado anteriormente na Figura 22. Esta formação da biomassa celular é essencial para a levedura repor a sua população uma vez que sempre ocorrem perdas de levedo na centrifuga.

5.2.6.3 Avaliação da produção de glicerol pelas leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 ao final do último ciclo fermentativo.

Os resultados obtidos demonstram claramente que a produção de glicerol pelas leveduras D1, D2 ficou bem acima da PE2, assim como em relação às demais cepas (Tabela 18).

Figura 24. Concentração de glicerol nos vinhos delevedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

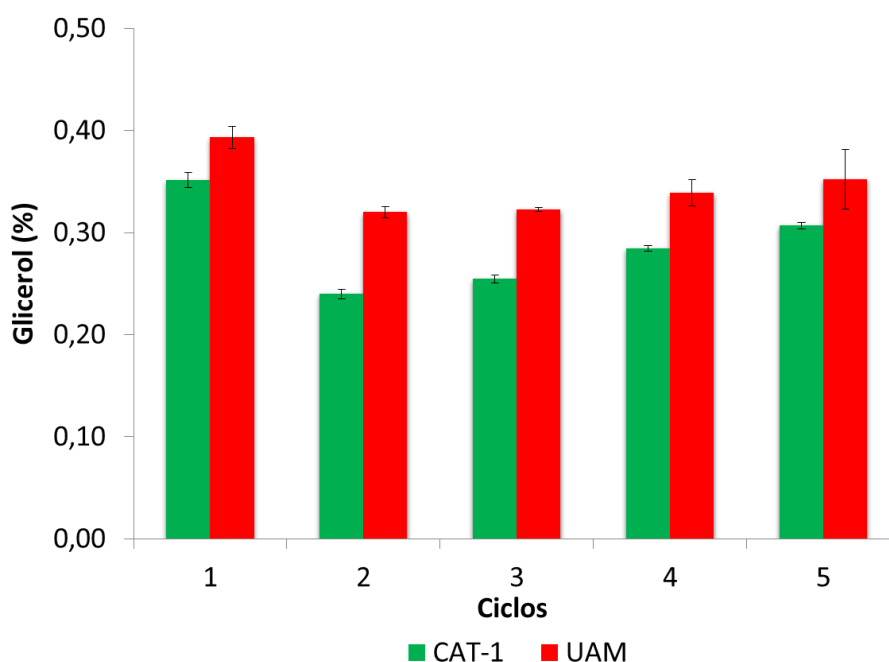


Tabela 17. Concentração de glicerol nos vinhos de levedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Levedura	Glicerol (g/100 mL) (%)					Média geral (Ciclos 1 a 5)
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	0.347	0.233	0.253	0.282	0.305	
	0.362	0.244	0.256	0.287	0.312	
	0.349	0.240	0.260	0.287	0.305	
	0.347	0.242	0.250	0.284	0.306	
MÉDIA	0.351	0.240	0.255	0.285	0.307	0.287
UAM	0.391	0.310	0.326	0.340	0.379	
	0.396	0.322	0.321	0.352	0.359	
	0.380	0.313	0.323	0.342	0.360	
	0.406	0.319	0.321	0.322	0.311	
MÉDIA	0.393	0.316	0.323	0.339	0.352	0.345

Tabela 18. Avaliação da produção de glicerol pelas leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 ao final do último ciclo fermentativo.

Parâmetro avaliado	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
Glicerol (%)	0,461	0,478	0,321	0,352	0,307
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Alto	Alto	Baixo	Baixo	Baixo

5.2.7 Rendimento Fermentativo

5.2.7.1 Comparação da D1, D2 e levedura PE2

Quando comparamos as médias gerais de rendimento dos três ciclos fermentativos, não encontramos diferenças significativas entre as leveduras. Com o passar dos ciclos, observamos uma redução no rendimento fermentativo das duas

leveduras da Alta Mogiana (D1 e D2), e aumento deste rendimento para a levedura selecionada (PE2). Para avaliar o rendimento fermentativo foram realizadas fermentações com mosto da Usina Alta Mogiana constituído por melaço diluído com água, 10% de células de levedura (p/v) e um teor de álcool no vinho entre 9 a 11% (v/v). Após o final da fermentação, o vinho foi centrifugado e as células de levedura tratadas com ácido sulfúrico durante 15 horas. Após o tratamento, as células de levedura foram novamente alimentadas com mosto de melaço/água para iniciar um novo ciclo de fermentação. O desempenho fermentativo das linhagens D1 e D2 foram avaliados durante cinco ciclos sucessivos, sendo o mesmo procedimento feito com a selecionada PE2.

As leveduras da Usina Alta Mogiana D1 e D2 apresentaram os melhores rendimentos nos 2 primeiros ciclos fermentativos, com diferenças significativas entre as médias da PE2, no 1º ciclo e no 2º ciclo, porém quando analisamos o 3º ciclo as leveduras D1 e D2 tiveram os menores rendimentos (Figura 25 e Tabela 19). Esta redução, foi devido à menor viabilidade das 2 leveduras. Houve uma redução da viabilidade a cada ciclo fermentativo, ficando inferior a 79% no 3º ciclo (Figura 17). Além da redução da viabilidade, o menor rendimento fermentativo observado para as leveduras D1 e D2 no terceiro ciclo de fermentação também pode ser atribuído à maior concentração de açúcares residuais no vinho. Na avaliação do rendimento fermentativo é necessário considerar que pequenas diferenças podem representar volumes enormes de etanol que deixariam de ser produzidos pela indústria. Além disso, diferentes leveduras podem apresentar diferenças significativas no rendimento da fermentação. Basso *et al.* (2008), demonstraram que as leveduras de panificação apresentavam um rendimento fermentativo de 88,1% contra 92,0% da PE2 nas mesmas condições de fermentação com reciclo de células. Estas diferenças foram diretamente relacionadas com a redução da viabilidade celular e com a maior produção de glicerol.

Outra característica associada à redução no rendimento da fermentação é a floculação das células da levedura (AMORIM *et al.*, 2011). As células floculadas não apresentam uma boa dispersão no meio de fermentação, sedimentam rapidamente e impedem a utilização eficiente e rápida dos açúcares do mosto pela levedura. Como demonstrado anteriormente, as análises realizadas ao microscópio óptico mostraram a formação de flocos grandes tanto para a levedura D1 como para a D2. Estes

resultados também estão consistentes com as observações realizadas por Amorim e Lopes (2013) sobre os prejuízos causados pelas leveduras floculantes.

Figura 25. Rendimento fermentativo das leveduras PE2, D1 e D2, durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

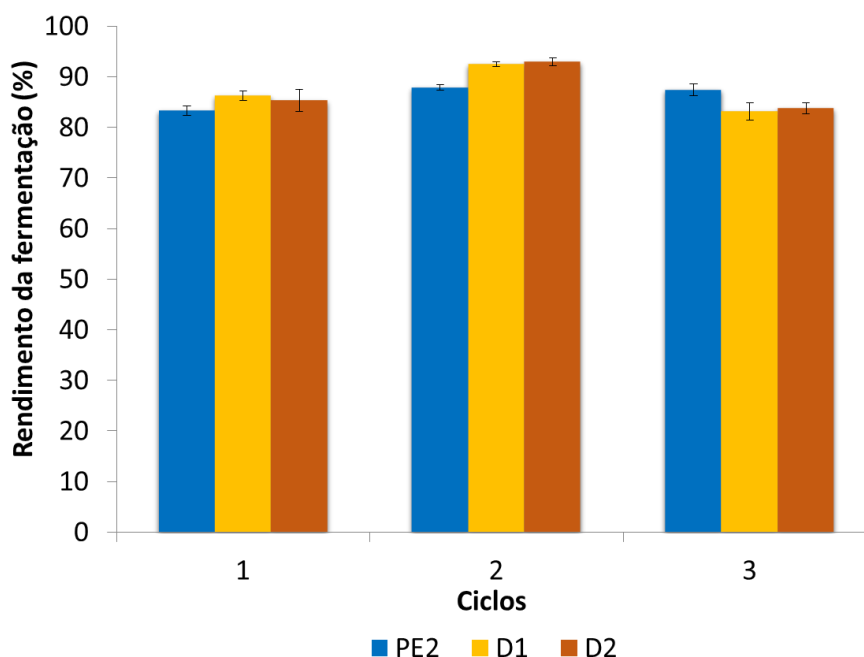


Tabela 19. Rendimento fermentativo das leveduras PE2, D1 e D2, durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	Rendimento fermentativo (%)			
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	Média geral (ciclos 1 a 3)
PE2	80.22	88.68	88.37	
	81.85	87.71	88.64	
	81.58	88.18	86.42	
MÉDIA	81.21	88.19	87.81	85.74
D1	83.81	91.79	84.93	
	84.81	92.06	81.73	
	85.28	92.67	83.15	
MÉDIA	84.63	92.17	83.27	86.69 a
D2	85.84	92.47	82.61	
	85.22	91.83	84.20	
	82.07	93.59	84.79	
MÉDIA	84.38	92.63	83.87	86.96

5.2.7.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

Em um segundo experimento, foi avaliado o desempenho fermentativo da levedura UAM em relação à linhagem CAT1. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 26 e demonstram que a UAM apresentou um desempenho no rendimento da fermentação semelhante ao da levedura CAT1, sem diferenças estatisticamente significativas quando se considera a média geral dos cinco ciclos fermentativos (Tabela 20). Considerando o último ciclo verificamos que a D1 e D2 apresentam os piores rendimentos e a UAM o melhor índice (Tabela 21).

É importante salientar que foi necessário realizar um numero maior de ciclos fermentativos durante a avaliação da levedura UAM, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no rendimento e na sobra de açúcares residuais nos primeiros ciclos fermentativos como tinha sido observado no experimento conduzido com as leveduras D1 e D2.

Figura 26. Rendimento fermentativo das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

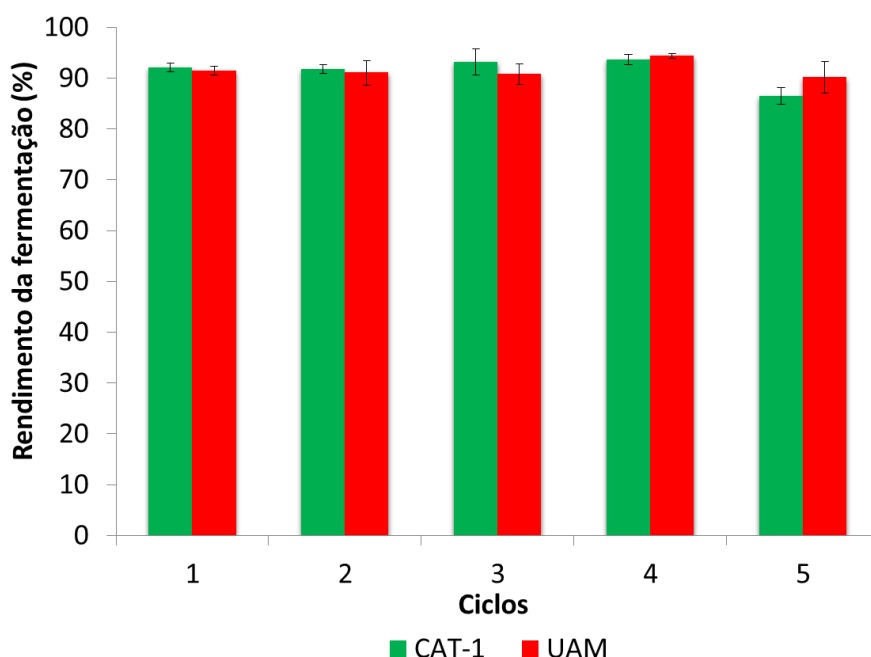


Tabela 20. Rendimento fermentativo das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Levedura	Rendimento fermentativo (%)					Média geral (ciclos 1 a 5)
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	90.8	90.9	89.5	93.7	87.2	
	92.7	92.2	95.1	92.6	84.6	
	92.5	91.3	95.0	94.6	87.7	
	92.5	92.8	93.2	93.3	86.0	
MÉDIA	92.1	91.8	93.2	93.6	86.5	91.45
UAM	92.6	92.9	93.2	94.2	92.3	
	90.5	91.3	88.8	94.5	91.7	
	91.1	92.5	91.5	94.9	90.9	
	91.8	87.6	89.5	93.9	85.6	
MÉDIA	91.5	91.1	90.8	94.4	90.1	91.57

5.2.7.3 Avaliação do rendimento fermentativo das leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 no último ciclo fermentativo

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a levedura UAM possui um desempenho fermentativo tão bom quanto o da CAT1 sendo que no último ciclo fermentativo a UAM conseguiu manter elevado o seu rendimento fermentando um mosto a base de melaço e água (Tabela 21). Por ser uma das principais características de interesse da indústria, a UAM demonstrou ser uma levedura de alto potencial para ser introduzida no processo industrial de fermentação alcoólica.

Tabela 21. Avaliação do rendimento fermentativo das leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 no último ciclo fermentativo

Parâmetro avaliado	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
Rendimento fermentativo (%) no último ciclo	83,27	83,87	87,81	90,1	86,5
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Baixo	Baixo	Alto	Alto	Alto

5.2.8 Consumo de ácido sulfúrico e pH das Leveduras

5.2.8.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

Durante o tratamento ácido do fermento, para se atingir pH 2,5 no pé-de-cuba, foram consumidas diferentes quantidades de ácido sulfúrico de um ciclo para outro, sendo que do 1º para o 3º ciclo todas as leveduras consumiram mais ácido (Figura 27 e Tabela 22). A variante D2 foi a levedura que mais consumiu ácido em todos os ciclos (média: 2,63g de ácido/L de pé-de-cuba). Estas diferenças no consumo de ácido demonstram como as leveduras podem afetar os custos de produção e o uso de alguns insumos. O tratamento ácido do levedo é uma etapa realizada na rotina das fermentações industriais para reduzir a contaminação bacteriana entre um ciclo e outro (AMORIM e LEÃO, 2005).

Em relação ao vinhos delevedurados, estes apresentaram valores de pH entre 4,70 e 4,88 dentro do esperado para fermentação normal (Figura 28 e Tabela 23).

Figura 27. Consumo de ácido sulfúrico (g/L de pé-de-cuba) das leveduras PE2, D1 e D2 para atingir pH 2,5 no tratamento do fermento (1h e 30 min.), em três ciclos fermentativos. Médias de três repetições

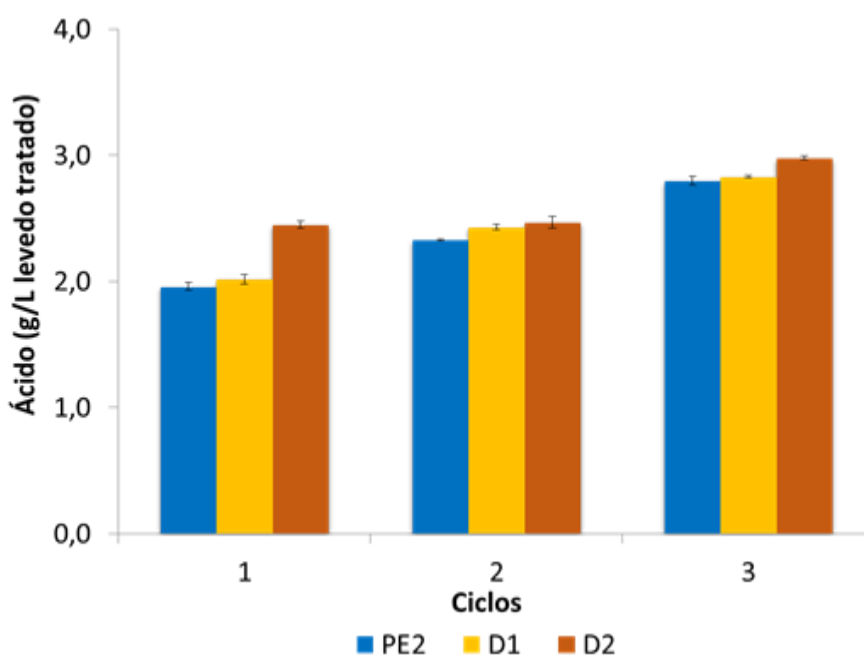


Tabela 22. Consumo de ácido (g de H₂SO₄/L de pé-de-cuba) para se obter pH 2.5 nos pés-de-cuba das leveduras PE2, D1 e D2, durante o tratamento do fermento por 1,5h. Médias de três repetições

Levedura	Consumo de H ₂ SO ₄ (g/L de pé de cuba)			
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	Média geral (ciclo 1 a 3)
PE2	1.87	2.38	2.80	
	1.93	2.38	2.80	
	2.06	2.23	2.80	
MÉDIA	1.96	2.33	2.80	2.36
D1	2.00	2.38	2.80	
	2.06	2.45	2.89	
	2.00	2.45	2.80	
MÉDIA	2.02	2.43	2.83	2.42
D2	2.45	2.45	2.98	
	2.45	2.52	2.98	
	2.45	2.45	2.98	
MÉDIA	2.45	2.47	2.98	2.63

Figura 28. Valores de pH dos vinhos delevedurados das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

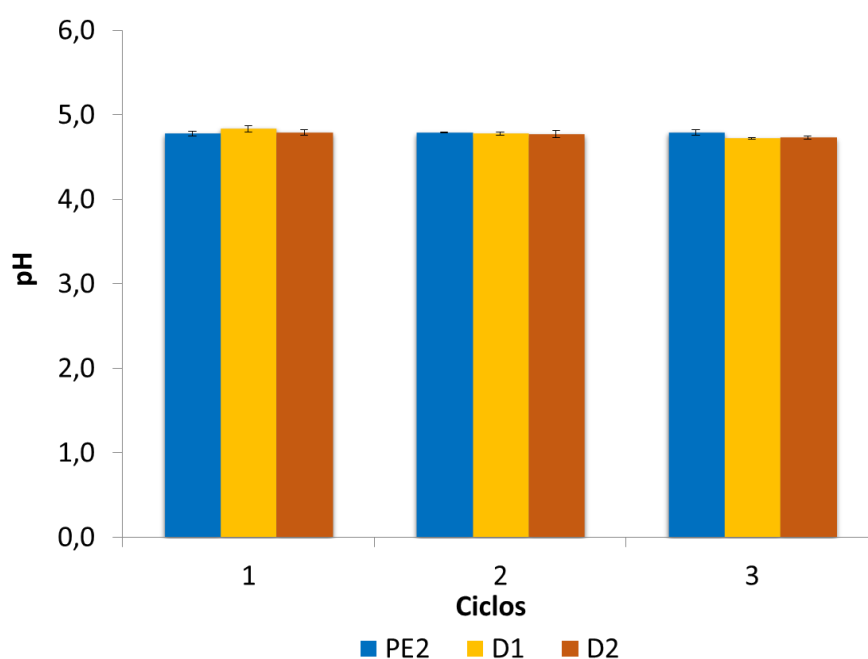


Tabela 23. Valores de pH dos vinhos de levedurados das leveduras PE2, D1 e D2 durante três ciclos fermentativos, após 9h de fermentação a 33°C. Médias de três repetições

Levedura	pH do vinho			Média geral (ciclos 1 a 3)
	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	
PE2	4.80	4.78	4.83	
	4.79	4.79	4.77	
	4.74	4.79	4.78	
MÉDIA	4.78	4.79	4.79	4.79
D1	4.82	4.80	4.72	
	4.81	4.76	4.71	
	4.88	4.77	4.73	
MÉDIA	4.84	4.78	4.72	4.78
D2	4.76	4.73	4.74	
	4.82	4.82	4.71	
	4.78	4.77	4.74	
MÉDIA	4.79	4.77	4.73	4.76

5.2.8.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

Durante o tratamento ácido do fermento, foi adicionada uma quantidade fixa de 1,8 g de ácido sulfúrico por litro de pé-de-cuba em cada tubo antes de iniciar cada ciclo (do 2° ao 5°), simulando a quantidade utilizada pelo processo sendo que, no primeiro ciclo não foi adicionado ácido sulfúrico (Figura 29 e Tabela 24).

O pH após o tratamento variou de 2,88 a 3,22 (dados não mostrados). Já o pH do vinho (Figura 30 e Tabela 25) após cada ciclo variou de 4,62 (mais baixo) a 4,92 (mais alto). Estes valores de pH representam os limites mínimo e máximo observados no vinho bruto tendo levado em consideração todas as repetições do experimento e em todos os ciclos fermentativos. Tais valores estão dentro do esperado para uma fermentação baseada em mostos de melaço e água.

As diferenças de pH entre as leveduras CAT1 e UAM só foram observadas no primeiro ciclo fermentativo, nos demais ciclos não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas leveduras.

Figura 29. Consumo de ácido sulfúrico (g/L de pé-de-cuba) das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33 °C. Médias de quatro repetições.

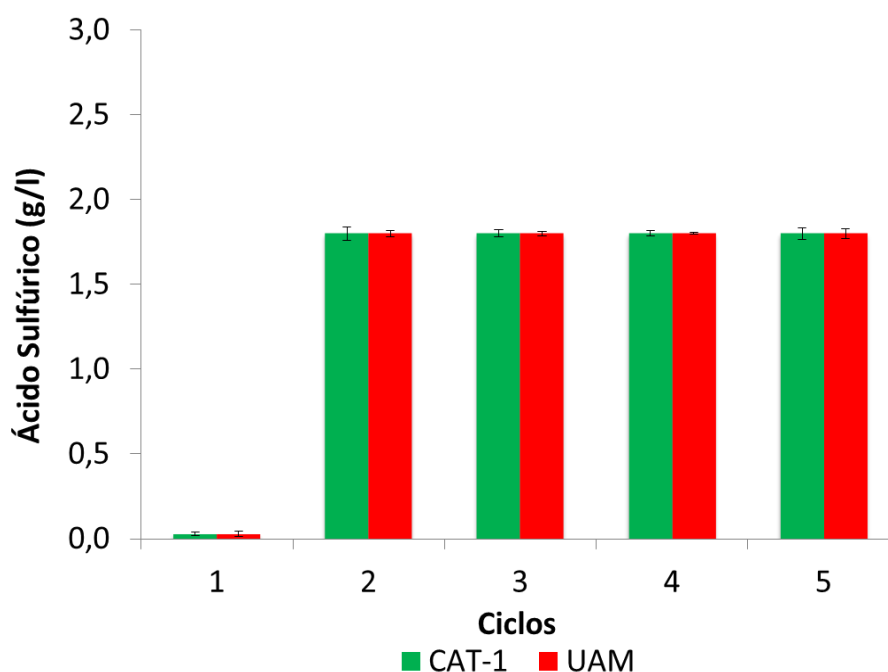


Tabela 24. Consumo de ácido sulfúrico (g/L de pé-de-cuba) das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33 °C. Médias de quatro repetições

Levedura	CONSUMO DE H ₂ SO ₄ (g/L de pé-de-cuba)					Média geral
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
MÉDIA	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
UAM	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	
MÉDIA	0.0	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

Figura 30. Valores de pH dos vinhos de levedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

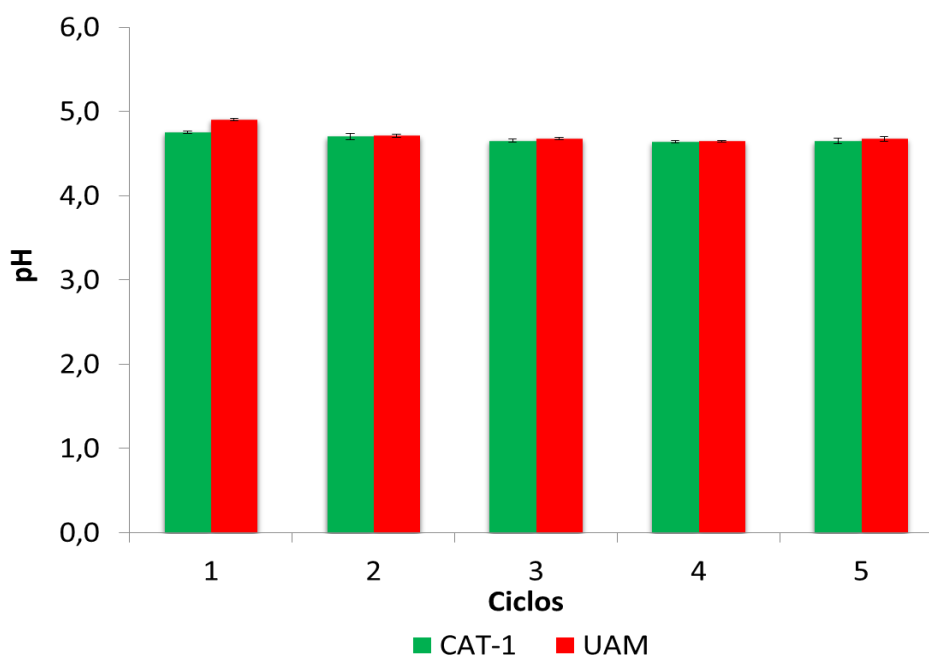


Tabela 25. Valores de pH dos vinhos de levedurados das leveduras CAT1 e UAM, durante cinco ciclos fermentativos, após 12,5h de fermentação a 33°C. Médias de quatro repetições

Levedura	pH do vinho					Media geral dos ciclos
	ciclo1	ciclo2	ciclo3	ciclo4	ciclo5	
CAT1	4.74	4.72	4.68	4.65	4.62	
	4.76	4.66	4.65	4.63	4.65	
	4.76	4.68	4.63	4.65	4.69	
	4.75	4.75	4.65	4.62	4.62	
MÉDIA	4.75	4.70	4.65	4.64	4.65	4.68
UAM	4.92	4.72	4.68	4.64	4.71	
	4.90	4.73	4.66	4.64	4.69	
	4.91	4.69	4.67	4.65	4.65	
	4.88	4.70	4.69	4.65	4.65	
MÉDIA	4.90	4.71	4.68	4.65	4.68	4.72

5.2.8.3 Avaliação do pH do vinho e consumo de ácido pelas leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 durante o tratamento do levedo.

O pH do vinho manteve-se estável dentro da faixa de 4,68 a 4,79. O consumo de ácido no tratamento não pode ser comparado devido a definição de dosagem fixa adotada no experimento realizado com a levedura UAM (Tabela 26).

Tabela 26. Avaliação do pH do vinho e consumo de ácido pelas leveduras D1, D2, PE2, UAM e CAT1 durante o tratamento do levedo.

Parâmetros avaliados	Experimento 1			Experimento 2	
	D1	D2	PE2	UAM	CAT1
pH vinho	4,78	4,76	4,79	4,72	4,68
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Consumo H ₂ SO ₄ (g/L cuba)	2,42	2,63	2,36	1,8	1,8
Lev. Pesquisadas x Lev. Seleccionadas	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

5.2.9 Velocidade da Fermentação das Leveduras

5.2.9.1 Comparação entre D1, D2 e a levedura PE2

A velocidade da fermentação é avaliada a cada ciclo pela perda de CO₂ em gramas no decorrer do tempo. Na Figura 31 e Tabela 27 são encontrados dados de velocidade e pode-se observar que a PE2 foi a levedura que apresentou maior velocidade de fermentação. Já as leveduras D1 e D2 ficaram com as menores velocidades de fermentação, o que também pode explicar a sobra de açúcar residual nos vinhos destas leveduras como já demonstrado anteriormente.

A redução na velocidade de fermentação está associada a contaminação por leveduras floculantes, redução da viabilidade celular, presença de compostos inibidores da fermentação, dentre outros (AMORIM e LEÃO, 2005). No caso de leveduras floculantes, algumas usinas acabam tendo que substituir todo o levedo, interrompendo o processo no meio da safra e sofrendo enormes prejuízos (AMORIM *et al.*, 2011). Além da menor velocidade de fermentação, a característica de floculação muitas vezes vem associada a formação de espuma em excesso e sobra de açúcares no vinho (BASSO *et al.*, 2008).

Figura 31. Velocidade de fermentação avaliada pela massa de CO₂ (g) desprendida durante a fermentação pelas leveduras PE2, D1 e D2 a 33°C. Média de três repetições

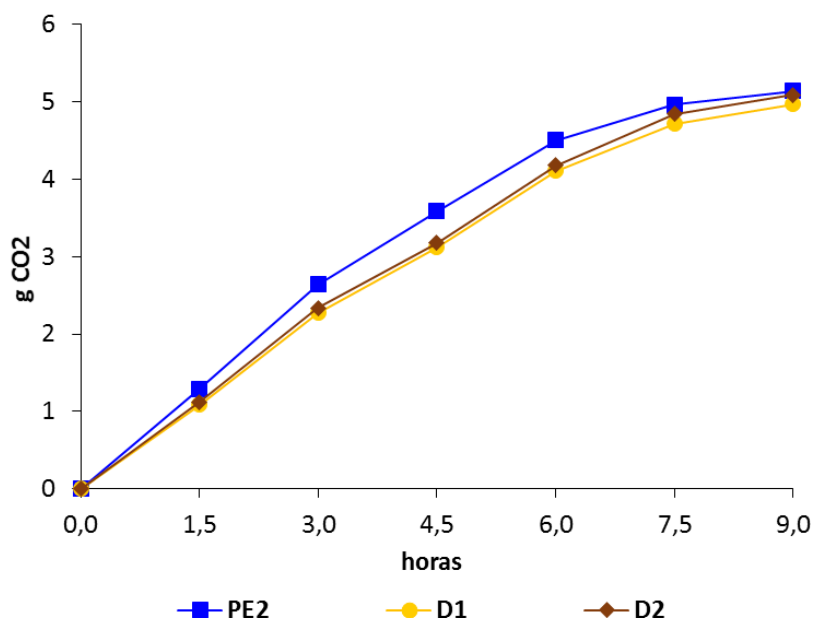


Tabela 27. Velocidade de fermentação avaliada pela massa de CO₂ (g) desprendida durante a fermentação pelas leveduras PE2, D1 e D2 a 33°C. Média de três repetições

Levedura	Ciclo	Liberação de CO ₂ (g)					
		1,5 h	3,0 h	4,5 h	6,0 h	7,5 h	9 h
PE2	1º	1.42	2.85	3.70	4.32	4.53	4.61
	2º	1.30	2.42	3.57	4.62	4.96	5.06
	3º	1.15	2.64	3.50	4.56	5.40	5.74
	Média	1.29	2.64	3.59	4.50	4.96	5.13
D1	1º	1.40	2.78	3.52	4.36	4.62	4.72
	2º	1.00	1.96	3.06	4.19	4.84	5.01
	3º	0.86	2.07	2.77	3.77	4.67	5.18
	Média	1.08	2.27	3.12	4.11	4.71	4.97
D2	1º	1.40	2.80	3.56	4.40	4.89	4.98
	2º	1.07	2.03	3.10	4.25	4.89	5.06
	3º	0.90	2.17	2.87	3.87	4.75	5.22
	Média	1.12	2.33	3.17	4.17	4.84	5.08

Tais características também foram observadas para as leveduras D1 e D2. Estas leveduras espumaram e perderam biomassa no primeiro ciclo fermentativo, o que comprometeu a avaliação da perda de CO₂ durante as pesagens. Mesmo assim podemos observar que no segundo e terceiro ciclos fermentativos as leveduras D1 e D2 apresentaram uma velocidade de fermentação muito menor que a PE2, especialmente nas 3 primeiras horas de fermentação.

5.2.9.2 Comparação entre UAM e a levedura CAT1

Na Figura 32 e Tabela 28, encontramos os dados de velocidade (média de cinco ciclos – e quatro repetições) e podemos observar que a UAM foi a levedura que apresentou maior velocidade de fermentação, na média dos 5 ciclos; o fato de termos controlado a formação de espuma por esta levedura, com o uso de dispersante, resultou no melhor desempenho fermentativo.

Figura 32. Velocidade de fermentação avaliada pela massa de CO₂ (g) desprendida durante a fermentação pelas leveduras CAT1 e UAM a 33°C. Média de cinco repetições

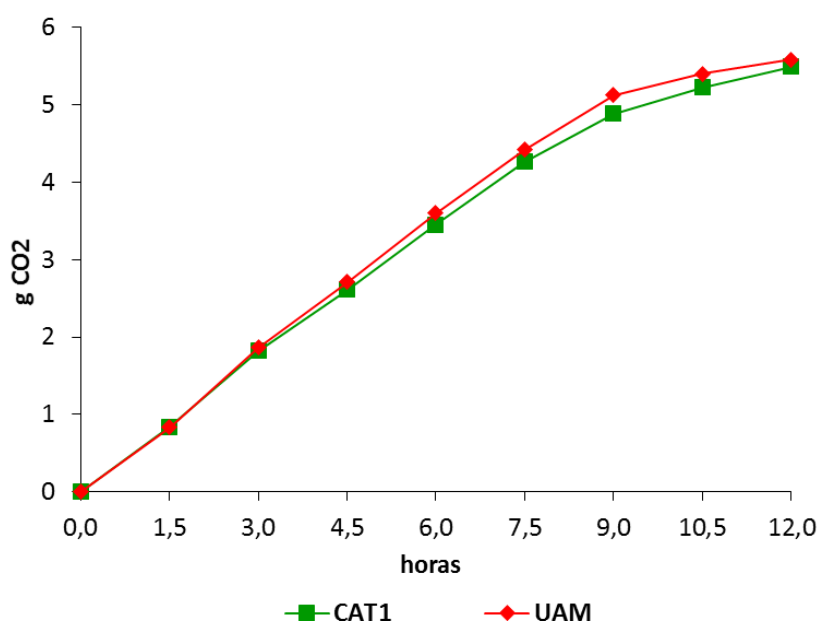
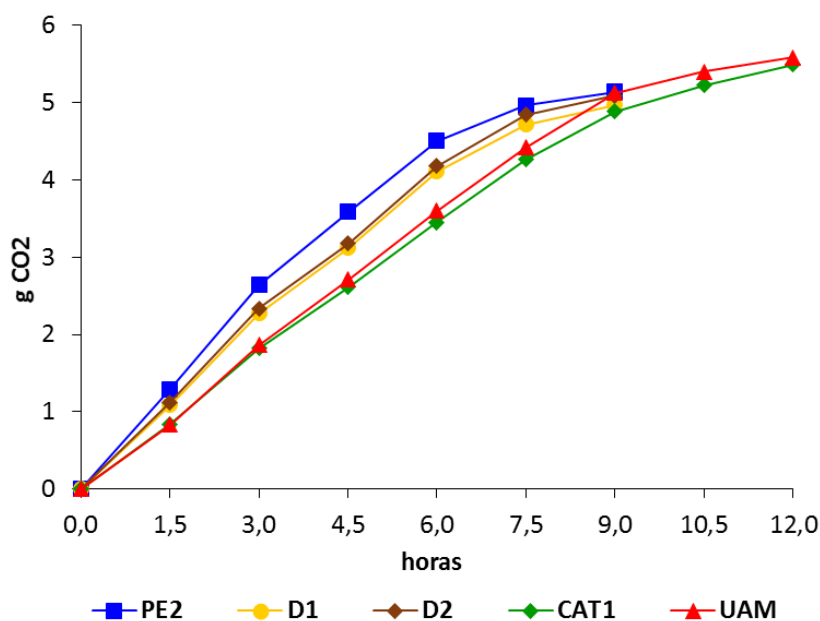


Tabela 28. Velocidade de fermentação avaliada pela massa de CO₂ (g) desprendida durante a fermentação pelas leveduras CAT1 e UAM a 33°C. Média de cinco repetições

Levedura	Ciclo	Velocidade de Fermentação (g de CO ₂)							
		1,5h	3h	4,5h	6h	7,5h	9h	10,5h	12h
CAT1	1º	1,08	2,14	3,24	4,33	5,31	5,55	5,53	5,73
	2º	1,11	2,25	3,12	3,94	4,91	5,62	5,70	5,76
	3º	0,83	1,84	2,61	3,47	4,29	5,04	5,52	5,73
	4º	0,65	1,43	2,25	2,99	3,70	4,48	5,02	5,50
	5º	0,54	1,44	1,84	2,50	3,07	3,73	4,31	4,71
	Média	0,84	1,82	2,61	3,45	4,26	4,88	5,22	5,49
UAM	1º	1,11	2,13	3,11	4,07	4,90	5,48	5,60	5,64
	2º	1,11	2,19	3,15	3,99	4,92	5,65	5,77	5,83
	3º	0,84	1,98	2,88	3,83	4,70	5,38	5,73	5,82
	4º	0,42	1,33	2,27	3,17	3,99	4,75	5,17	5,41
	5º	0,66	1,66	2,13	2,94	3,60	4,33	4,74	5,20
	Média	0,83	1,86	2,71	3,60	4,42	5,12	5,40	5,58

5.2.9.3 Avaliação da velocidade de fermentação da D1, D2, PE2, UAM e CAT1

Figura 33. Velocidade de fermentação avaliada pela massa de CO₂ (g) desprendida durante a fermentação pelas leveduras D1, D2 e PE2 (média de 3 ciclos) e leveduras CAT1 e UAM (média de 5 ciclos) a 33°C. Evidencia-se que a UAM apresenta um melhor resultado em relação a CAT1.



5.2.10 Avaliação das cepas D1, D2 e UAM em relação às leveduras PE2 e CAT1

No experimento com reciclo fermentativo as leveduras D1 e D2 demonstraram ser flocculantes, produtoras de espuma, produziram menos álcool, viabilidade baixa, açúcar residual maior, alta produção de glicerol e baixo rendimento (Tabela 29). Esses resultados indicam que não seriam recomendadas para introdução no processo fermentativo da Alta Mogiana. Apesar de reunirem características indesejáveis para os processos industriais de fermentação alcoólica, as leveduras D1 e D2 possuem a capacidade de contaminar e de se estabelecer na fermentação da Usina Alta Mogiana, sendo capazes de causar sérios prejuízos durante a safra.

A UAM apresentou como habilidade inferior uma formação mais abundante de espuma quando comparada com a levedura CAT1. Nas demais habilidades fermentativas comportou-se no mínimo igual a CAT1, apresentando características muito apropriadas (Tabela 29), sendo recomendada para introdução e aplicação no processo fermentativo da Alta Mogiana.

Tabela 29. Avaliação das cepas D1, D2, UAM, PE2 e CAT1 quanto aos parâmetros de importância industrial

Parâmetros	D1	D2	UAM	PE2	CAT1
Floculação	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Espuma	Espumante	Espumante	Espumante	Não espumante	Não espumante
Teor Alcoólico	< 10%	< 10%	> 10%	> 10%	> 10%
Viabilidade	Reduzida	Reduzida	Normal	Normal	Normal
Açúcares Resduais	Alto	Alto	Baixo	Baixo	Baixo
Biomassa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Glicerol	Alto	Alto	Baixo	Baixo	Baixo
Rendimento Fermentativo	Baixo	Baixo	Alto	Alto	Alto
Consumo de Ácido	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
pH	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Velocidade de Fermentação	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Obs.: foi considerado uma característica “normal” aquela que repetisse a habilidade das leveduras selecionadas (PE2 e CAT1) usadas como referência.

5.3 Aplicação da levedura UAM nas safras 2011, 2012, 2013 e 2014

Após a confirmação das habilidades fermentativas da cepa UAM nos experimentos realizados em escala de laboratório, a partir de 2011 a levedura selecionada foi introduzida no processo industrial de fermentação alcoólica da Usina Alta Mogiana no início de cada safra junto com outras cepas industriais (CAT1 e PE2). A dominância e persistência da UAM na fermentação industrial, assim como de outras leveduras, foi acompanhada pelas análises de cariotipagem.

5.3.1 Cariotipagens das safras 2011, 2012, 2013 e 2014

Com o resultado de laboratório recomenda o uso da UAM introduziu-se sua linhagem no início nas Safras 2011 (Figura 34), 2012 (Figura 35), 2013 (Figura 36) e 2014 (Figura 37) juntamente com a PE2 e CAT1. Os resultados obtidos demonstraram que a levedura UAM dominou a população de leveduras ao longo de cada safra, substituindo as cepas tradicionais (PE2 e CAT1) além de evitar a contaminação e estabelecimento de cepas selvagens.

Figura 34. Dominância das leveduras na fermentação industrial em 2011. As leveduras foram identificadas e monitoradas pela cariotipagem. O tempo 0 (zero) determina o início do processo fermentativo quando foram utilizados 1.000 kg de PE2, 1.000 kg de CAT1 e 2,5 kg de UAM. A partir de 70 dias de safra a levedura UAM dominou completamente a fermentação até final de safra.

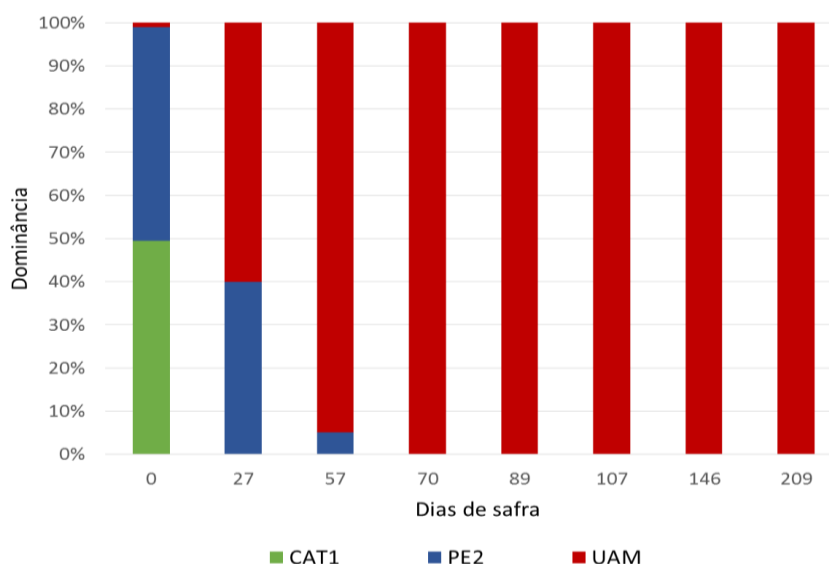


Figura 35. Dominância das leveduras na fermentação industrial em 2012. As leveduras foram identificadas e monitoradas pela cariotipagem. O tempo 0 (zero) determina o início do processo fermentativo quando foram utilizados 1.000 kg de PE2, 1.000 kg de CAT1 e 2,5 kg de UAM. A partir de 85 dias a levedura UAM predominou.

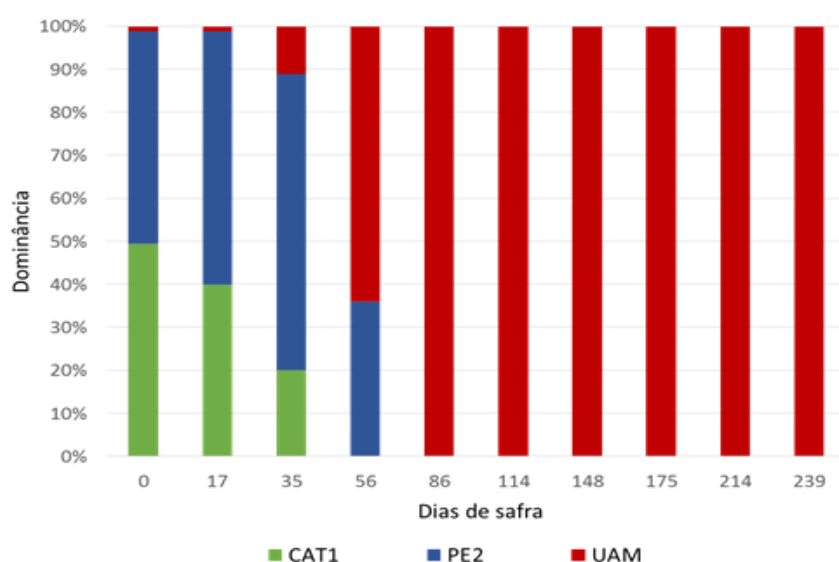


Figura 36. Dominância das leveduras na fermentação industrial em 2013. As leveduras foram identificadas e monitoradas pela cariotipagem. O tempo 0 (zero) determina o início do processo fermentativo quando foram utilizados 500 kg de PE2, 500 kg de CAT1 e 2,5 kg de UAM. A partir de 130 dias a UAM predominou.

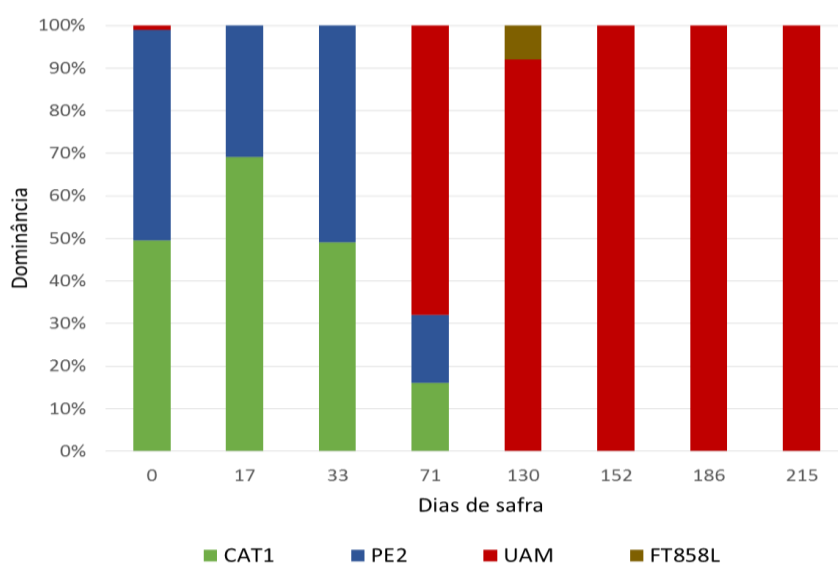
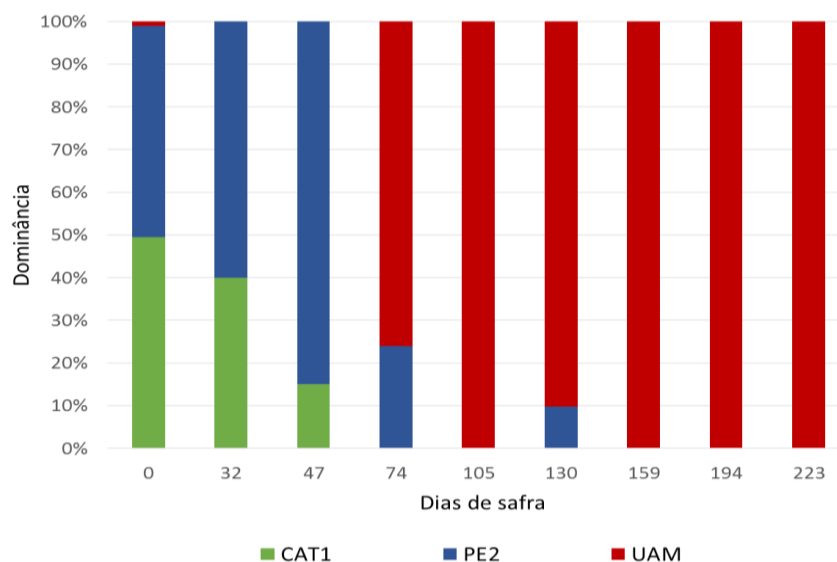


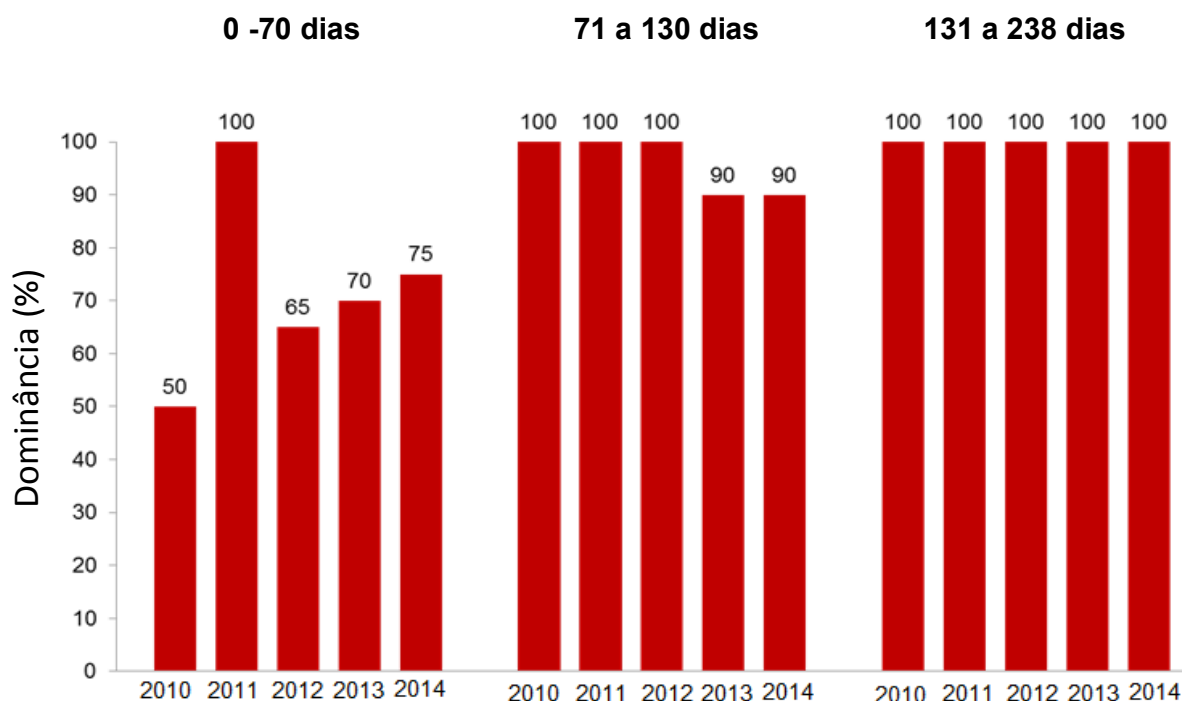
Figura 37. Dominância das leveduras na fermentação industrial em 2014. As leveduras foram identificadas e monitoradas pela cariotipagem. O tempo 0 (zero) determina o início do processo fermentativo quando foram utilizados 500 kg de PE2, 500 kg de CAT1 e 2,5 kg de UAM. Com 159 dias a UAM predominou até o final da safra.



5.3.2 Resumo da Cariotipagem da UAM – Safras 2010 a 2014

Os resultados mostram que as leveduras selecionadas dão lugar a linhagem UAM variando a porcentagem de dominância de 50% a 75% até os primeiros 70 dias de safra, de 90% a 100%, dos 71 até 130 dias e a partir disso obtém-se 100% de dominância da UAM. Ressalta-se que a partir da introdução da levedura UAM no início da safra juntamente com as selecionadas PE2 e CAT1, em nenhum momento tivemos a presença de leveduras selvagens, o que reforça sua habilidade de dominância (Figura 38). Na safra 2013 tivemos o surgimento nos 130 dias, da levedura selecionada FT858L. Essa levedura passou a ser comercializada a partir da safra 2011, juntamente com as demais selecionadas. Assim analisou-se que na aquisição da PE2 e CAT1 um dos pacotes de 10kg possuía FT858L. A presença da FT 858L detectada somente nos 130 dias de safra, sugere que a mesma veio por engano (pacote de 10kg) junto com os 1.000kg da PE2 e 1.000kg da CAT1 dosados no início juntamente com os 5kg da UAM. Essa ocorrência serviu para reforçar que mesmo a FT858L sendo uma nova levedura selecionada, não conseguiu se manter face a capacidade de dominância da UAM.

Figura 38. Dominância da levedura UAM em cada safra, considerando intervalos de 0-70, 71-130 e 131-238 dias.



5.4 Considerações Gerais

5.4.1 Parâmetros Avaliados durante antes e após a introdução da levedura UAM na fermentação industrial

Esta avaliação baseou-se na comparação entre dois períodos que compreenderam as safras 2002 a 2009, sem a introdução da levedura UAM e um segundo período, entre 2010 e 2014 que compreende as safras em que a levedura surgiu espontaneamente (2010) ou foi introduzida na fermentação industrial no início de cada safra subsequente (2011, 2012, 2013 e 2014). Estes resultados representam as médias obtidas em cada período e estão apresentadas na Tabela 30. Apesar da diferença no número de safras avaliadas, a produção de etanol, de açúcar e a cana processada pela Usina Alta Mogiana foram muito semelhantes para os dois períodos avaliados como demonstrado na Tabela 31.

O rendimento foi uma das variáveis analisadas tendo sido observado um ganho médio da ordem de 5%. Este aumento no rendimento da indústria pode ser

explicado pela redução do açúcar residual no vinho e pela menor formação de glicerol na fermentação. Ou seja, menos açúcar foi desviado para produção de glicerol ou perdido no vinho sem fermentar. Além disso, é importante salientar que houve uma elevação da viabilidade celular e uma maior produção de biomassa de leveduras mesmo com o aumento do teor alcoólico quando comparamos as médias de safra dos dois períodos. Estes resultados sugerem que a levedura UAM apresenta tolerância a teores alcoólicos mais elevados. Esta é uma característica que tem sido buscada na seleção de novas leveduras para processos industriais de fermentação alcoólica (AMORIM *et al.*, 2011). De outra forma, não teria sido possível elevar o grau alcoólico das fermentações sem comprometer a viabilidade celular da levedura, a renovação e a reposição da sua biomassa celular. Estes resultados também foram observados nos experimentos em escala de laboratório quando a UAM foi comparada com a CAT1 durante cinco ciclos fermentativos. Sem esta reposição de biomassa e a manutenção de uma viabilidade celular elevada, não seria possível para a levedura se manter no processo.

De acordo com Alexandrino (2012) o aumento do teor alcoólico causa uma condição adversa para a sobrevivência e multiplicação da levedura, sendo que representa um ponto-chave para a seleção de novas linhagens destinadas aos processos industriais de fermentação alcoólica no país que buscam elevar o teor alcoólico no vinho e reduzir os volumes de vinhaça. Esta elevação do teor alcoólico das fermentações brasileiras tem sido considerada um dos desafios científicos para a melhoria dos processos industriais e redução do impacto econômico e ambiental causado pela vinhaça (AMORIM *et al.*, 2011).

Outras três variáveis analisadas foram o consumo de ácido sulfúrico, o pH do levedo tratado e a floculação. Os resultados obtidos demonstram que no período em que a levedura UAM foi a linhagem predominante houve uma redução da floculação do levedo, acompanhada de um tratamento ácido com pH mais elevado e redução do consumo de ácido. Vários fatores podem interferir no pH do levedo tratado e no consumo de ácido, mas é importante destacar que nas safras em que a levedura UAM foi dominante, houve uma menor floculação. Em geral, quando ocorrem problemas de floculação na fermentação é comum o operador fazer um tratamento ácido do levedo com maior rigor na tentativa de desflocular as células e prepará-las para o próximo ciclo fermentativo. Isso ocorre especialmente quando a fermentação torna-se contaminada por bactérias que floculam o levedo. Então, é

possível demonstrar que com menor floculação do levedo também poderíamos esperar um menor consumo de ácido e um pH mais elevado. Mesmo assim, não está sendo descartada a hipótese de outros fatores terem contribuído para estes resultados mas fica muito evidente a redução da frequência de problemas relacionados com a floculação no período em que a UAM foi dominante.

A floculação ocorre quando as células da levedura se aglomeram, formando flocos que sedimentam rapidamente e prejudicam a centrifugação e a velocidade de fermentação. A floculação das células pode ser causada pela contaminação bacteriana (CHERUBIM, 2003) ou por características da própria levedura. Figueiredo (2012) demonstrou a relação entre os genes *FLO1*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11* e sua regulação pelo gene *FLO8* na formação de flocos. Isso significa que algumas leveduras carregam na sua bagagem genética os genes necessários para floculação das suas próprias células. Estas leveduras podem ser interessantes para processos com reciclo de células sem centrifugas, como é o caso das fermentações para produção artesanal de cachaça (SOARES *et al.*, 2011). Por outro lado, trata-se de uma característica indesejável para as fermentações industriais que visam a produção de etanol e utilizam centrífugas (AMORIM e LOPES, 2013).

Tabela 30. Resultados obtidos em escala industrial em dois períodos sendo o primeiro sem a levedura UAM (2002 a 2009) e o segundo, após a seleção e introdução da levedura na fermentação industrial (2010 a 2014).

Parâmetros	2002 a 2009 (8 Safras)		2010 a 2014 (5 Safras)		Resultado*
	Média	Nº de Análises	Média	Nº de Análises	
1 - Teor alcoólico % (v/v)	8,72	10.980	10,03	6.816	+ 15%
2 -Viabilidade celular %	81,47	3.660	84,68	2.272	+ 4%
3 - AT % Vinho	0,0729	21.960	0,0552	13.632	- 25%
4 - Biomassa % AT Mosto	2,19	21.960	2,89	13.632	+ 32%
5 - Glicerol % AT Mosto	2,424	21.960	2,049	13.632	- 15%
6 - Consumo ácido sulfúrico (g/L cuba)	2,653	-	2,051	-	- 23%
7 - pH levedo (cuba)	2,287	21.960	2,380	13.632	+ 4%
8 - Floculação %	28,00	21.960	15,51	13.632	- 45%
9 – Rendimento industrial % (RTC)	88,11	1.830	92,84	1.136	+ 5%
10 - Consumo Antiespumantes (g/L etanol)	0,62	-	0,74	-	+ 19%

* O resultado refere-se a porcentagem de aumento/redução observado em relação ao período de 2002-2009.

Tabela 31. Produção de etanol e de açúcar nos dois períodos avaliados, sendo o primeiro sem a levedura UAM (2002 a 2009) e o segundo, após a seleção e introdução da levedura na fermentação industrial (2010 a 2014).

Produtos	2002 a 2009 (8 Safras)	2010 a 2014 (5 Safras)	5 Safras 8 Safras (%)
Etanol (L)	718.833.551	742.759.852	+ 3,3
Açúcar (sacos de 50 kg)	47.691.533	44.998.777	- 5,6
Cana (ton.)	26.909.033	26.989.118	+ 0,3

Dentre as características avaliadas para seleção de uma levedura industrial de alto desempenho, apenas a formação de espuma pela UAM se mostrou acima do esperado. A formação de espuma é uma característica que está diretamente relacionada com a linhagem de levedura. Leveduras industriais como PE2, CAT1, FT858L, Barra Grandre 1 – (BG1) e Santa Adélia 1 – (SA1) produzem pouca espuma quando comparadas com leveduras contaminantes (AMORIM e LOPES, 2013). Esta formação de espuma está relacionada à hidrofobicidade da parede celular das leveduras como demonstrado por Figueiredo (2008) e o principal problema causado ao processo é o aumento no consumo de dispersantes e antiespumantes para reduzir a formação das espumas durante a fermentação.

Os resultados observados no processo industrial de fermentação da Usina Alta Mogiana quanto ao consumo de dispersantes e antiespumantes estão em concordância com os resultados obtidos nos ensaios de fermentação em laboratório que compararam a formação de espumas pela UAM com a levedura CAT1. Apesar desta característica não ter sido avaliada positivamente para a UAM, as demais habilidades fermentativas que foram observadas durante cinco safras consecutivas permitem afirmar que o uso desta levedura pela indústria apresenta mais vantagens do que desvantagens.

5.4.2 Avaliação da dominância da UAM

Foram comparadas as habilidades da levedura UAM com a selecionada CAT1 e somente no item formação de espuma ela demonstrou resultado inferior. Porém, quando foi avaliada a capacidade de dominância total nas safras 2010, 2011, 2012, 2013 e 2014 onde foram processadas 26.989.118 toneladas de cana e

produzidos 742.759.852 litros de etanol, concluiu-se que a usina já possui sua levedura personalizada, diminuindo significativamente o risco de uma cepa selvagem invadir seu processo fermentativo. Evidencia-se que em nenhuma das 4 últimas safras em que ela foi introduzida desde o início, detectou-se a presença de levedura selvagem. O conhecimento aprendido na gestão da fermentação nessas 5 safras passam a ser o grande diferencial operacional, a medida que se conhece o comportamento da UAM quanto a:

- a) Teor alcoólico que pode ser alcançado na dorna sem prejudicar sua viabilidade. Nesse item obtivemos um resultado que contesta a observação feita por BASSO *et al.* (2011), pois alcançamos um teor médio de 10,03 não sentindo estresse na levedura, confirmado pela maior viabilidade celular.
- b) Conhecer o pH de operação ideal e com isso controlar o consumo de ácido sulfúrico sem prejudicar a viabilidade da UAM e ajudar o controle microbiológico. Conforme citado por SOUZA *et al.* (2007), o tratamento e descontaminação com um pH de 2,38 (citação até 2,5) mostrou-se eficaz para iniciar a fermentação em ótimas condições.
- c) Conhecer as condições que podem provocar floculação da UAM e controlá-las de maneira eficaz. Aqui a observação de LUDWIG *et al.* (2001) foi confirmada, pois com uma redução de 45% na floculação, contribuiu para manutenção da biomassa, não exigindo gasto na reposição celular.
- d) Condução da fermentação para a produção mínima de glicerol. Conforme citado por PACHECO (2012), a formação de glicerol seria uma resposta ao estresse osmótico quando se trabalha com altas concentrações de açúcares, como no caso da usina estudada. Conseguiu-se uma redução de 15% de glicerol o que contribuiu para a manutenção da biomassa, conseguindo 32% a mais de células, ajudando no aumento da eficiência por não precisar gastar açúcar para reposição.

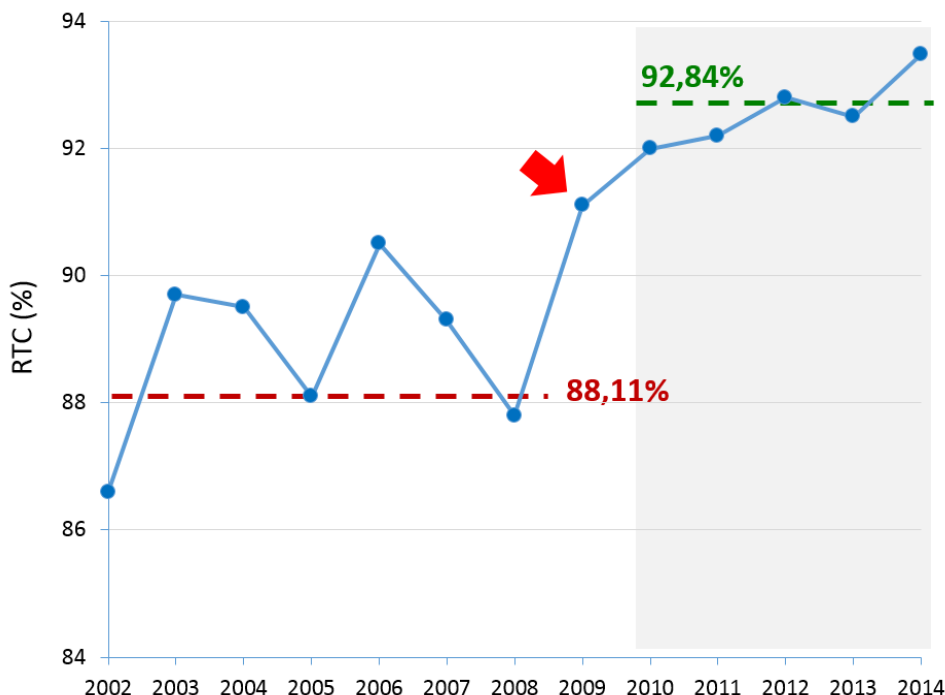
- e) Quantidade de açúcares residuais para iniciar a operação de separação do fermento do vinho (centrifugação) considerando os itens anteriores. Menos floculação, utilização de menor quantidade de ácido, menor índice de reposição de células, todos esses itens contribuíram para baixos índices de açúcar residual para aumentar a eficiência.
- f) Gestão no uso de antibióticos para combater as infecções e ingredientes para aumentar a reprodução. Aliando-se um teor alcoólico de 10,03 a um pH de 2,38 e uma viabilidade de 84,68, a utilização de antibióticos e nutrientes passou a ocorrer com menor frequência, a medida que algum desses números apresentassem variações, sempre relacionando com o índice de floculação.
- g) Utilização de sistemas e produtos de alta eficiência na busca do controle de espuma pela UAM. Como a levedura UAM tem na sua natureza a capacidade de gerar mais espuma que uma selecionada, buscamos tecnologias de controle automatizadas, além de testar produtos eficazes de combate com periodicidade controlada.
- h) Controlar a velocidade de alimentação da dorna na busca da melhor eficiência de fermentação, controle de temperatura e produção de espuma.
- i) O volume de CO₂ produzido, bem como o sistema de lavagem para recuperação do etanol contido nesse gás.
- j) Mantido o monitoramento recomendado pela Fermentec, 2012, confirmamos a afirmação de FIGUEIREDO (2012) que leveduras selecionadas levam a maiores rendimentos.

5.5 Resultados técnicos econômicos decorrentes do uso da levedura UAM

5.5.1 Aumento do rendimento industrial (RTC)

Os resultados obtidos a partir da Usina Alta Mogiana durante 12 safras sucessivas apresentou dois períodos distintos. O primeiro, sem a levedura UAM e, o segundo com a presença e dominância de UAM no processo industrial de fermentação alcoólica da Usina. Os resultados do RTC representam a porcentagem de recuperação de açúcar a partir da cana levando em consideração o mix de produção (etanol:açúcar) pela indústria. Cada ponto na Figura 39 representa o RTC médio para cada safra.

Figura 39. Evolução do rendimento industrial (RTC) durante sucessivas safras. Linhas vermelhas tracejadas representam a média dos anos sem a levedura UAM (2002-2009) enquanto que as linhas verdes tracejadas representam a média de cinco anos trabalhando com a levedura UAM (2010-2014). É importante considerar o resultado intermediário observado em 2009, quando a UAM surgiu naturalmente pela primeira vez no processo de fermentação da usina Alta Mogiana (seta vermelha)



Durante o período compreendido entre 2002-2009 o rendimento industrial apresentou média de 88,11% enquanto que, para o período entre 2010-2014,

observou-se maior rendimento industrial (92,84%) em relação ao primeiro período sem UAM. O ganho de eficiência foi de 4,73% tendo uma contribuição importante do rendimento da fermentação.

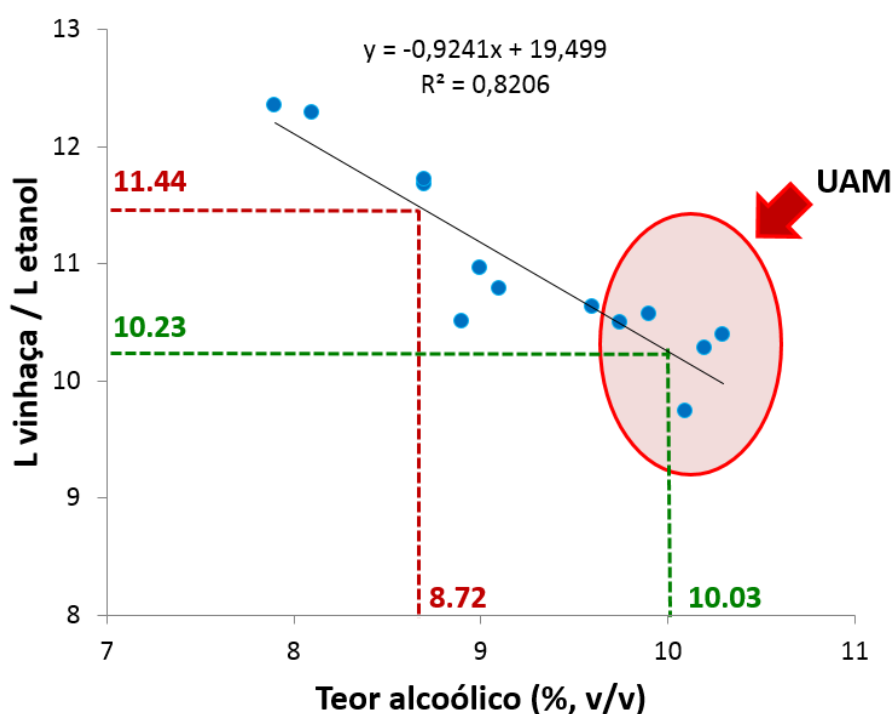
Esses resultados foram facilmente demonstrados para o RTC, uma vez que considera a produção total de açúcar e etanol por safra e está diretamente relacionado com a introdução da UAM no processo de fermentação alcoólica. Essa introdução propiciou um aumento de forma direta para o aumento do RTC.

5.5.2 Redução do Volume de Vinhaça

Outro aspecto muito importante a ser considerado é o volume de vinhaça gerada por litro de etanol produzido. Os resultados mostraram que a dominância da levedura UAM permitiu à Usina trabalhar com um conteúdo de álcool mais elevado nos tanques de fermentação e, conseqüentemente, reduzir o volume de vinho a ser destilado e a vinhaça. Esta redução foi de 1,21 litro de vinhaça por litro de etanol produzido (Figura 40). Ou seja, baixou de 11,44 para 10,23 litros de vinhaça por litro de etanol. Considerando-se uma produção de 742.759.852 de litros de etanol em 5 safras, isso representa redução de 898.739.421 litros de vinhaça nessas safras. Se considerarmos o custo de transporte para aplicação R\$ 5,83/m³ para um raio médio de 25km, foi possível economizar R\$ 5.239.650,00 ou seja R\$ 1.0479.930,00/safra. Fermentações alcoólicas com baixas concentrações de etanol no vinho aumentam os custos de produção, uma vez que estas fermentações consomem muito mais do bagaço e vapor para a destilação do que os processos de fermentação com teores alcoólicos mais elevados (AMORIM et al., 2011).

Além disso, as baixas concentrações de etanol no vinho geram grandes volumes de vinhaça. Em média, as destilarias brasileiras geram 12 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido, que correspondem a cerca de 8,5% da concentração de etanol no vinho. Na usina estudada esse teor alcançou 10,03% nas últimas 5 safras. Isto significa que para cada dorna do processo com capacidade de 1000m³, produziu-se 103.000 litros de etanol, contra 85.000 litros para as usinas que tiveram teor médio de 8,5%. Logo com o mesmo equipamento alcança-se maior produção.

Figura 40. Redução dos volumes de vinhaça por litro de etanol produzido em função do aumento da concentração de etanol no vinho. Linhas vermelhas tracejadas representam a média de oito anos consecutivos (2002-2009) sem uma linhagem de levedura selecionada, dominante até o final da safra. Linhas verdes tracejadas representam a média de cinco anos trabalhando com a levedura UAM (2010-2014). Observação: o círculo representa os cinco anos em que a UAM foi a levedura dominante. É importante considerar o resultado próximo observado a partir de 2009, quando UAM surgiu naturalmente pela primeira vez no processo de fermentação da Usina Alta Mogiana



5.5.3 Economia no consumo de bagaço

Quando conseguimos processar uma concentração de açúcar maior por dorna, alcançamos um teor alcoólico superior. Como decorrência desse ganho gastamos menos vapor no processamento, por este estar mais concentrado, ou seja com menos água para ser retirada. Isto propicia uma economia do vapor do processo utilizado na destilação de acordo com o teor alcoólico alcançado na fermentação (dados do fabricante Dedini). Utilizando a média de teor alcoólico das 8 safras (2002 a 2009) de 8,72%, obteve consumo de 2,37kg de vapor. Para 10,03% média das últimas 5 safras (2010 a 2014) obteve consumo de 2,15kg por litro de

etanol (Figura 41). Portanto, uma economia de 0,22kg de vapor por litro de etanol produzido (LEHC). Para produção de 742.759.852 litros de etanol teremos: 0,22kg vapor/LEHC x 742.759.852 LEHC = 163.407,20 toneladas de vapor.

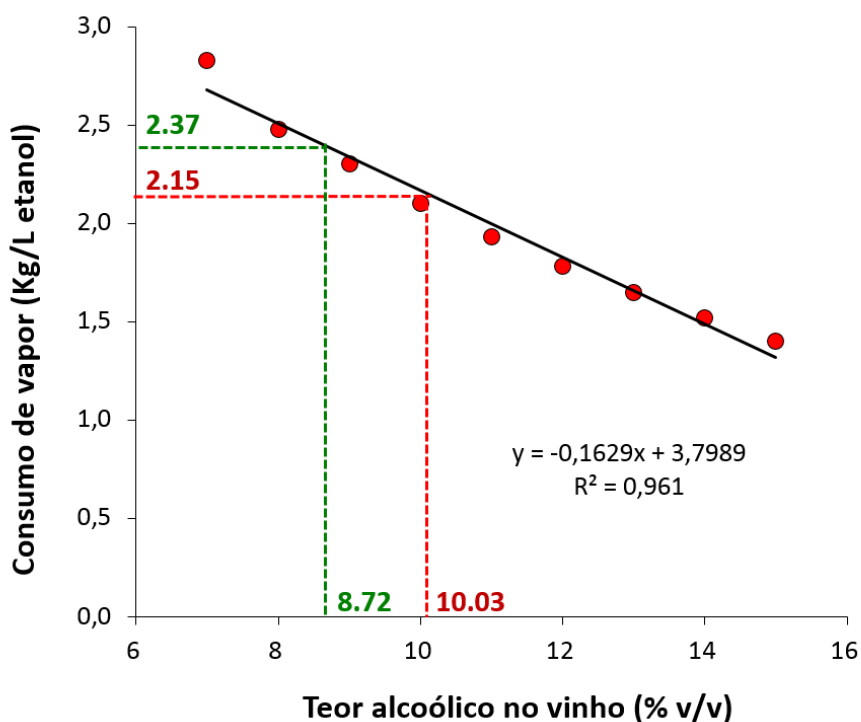
Considerando que cada tonelada de bagaço produz 2,2 ton. de vapor, pode-se concluir que: 163.407,20 toneladas de vapor correspondem a 74.276 toneladas de bagaço, (uma economia de quase 75.000 toneladas de bagaço nas últimas 5 safras). Esse bagaço poderia ser comercializado ou gerar energia (15.000 ton/safra). Ou seja, este bagaço excedente apresenta duas possibilidades de receita:

Opção A: Venda in natura (R\$60,00/ton) ou R\$ 900.000,00/safra

Opção B: Geração de energia na UAM se obtém 720MWH/dia com um consumo de 2.500ton bagaço/dia. Logo, 15.000 / 2.500 = 6 dias de operação produzindo 6x720 = 4.320 MWH vendidos a R\$ 200,00 MWH; alcançariamos a receita de R\$ 864.000,00.

A segunda opção seria normalmente preferida uma vez que durante os 6 dias de operação a usina não gasta energia externa.

Figura 41. Consumo de vapor de acordo com o teor alcoólico do vinho



5.5.4 Gasto envolvido com produto químico para combate da espuma produzida pela UAM

Em relação ao período sem a levedura UAM (2002 – 2008), tivemos um aumento no consumo de antiespumantes mais dispersantes de 0,12 g/l de etanol produzido. Logo em 5 anos alcançamos a produção de 742.759.852 litros. Portanto, gastamos $0,12 \text{ g/l} \times 742.759.852 \text{ L} = 89.131.180 \text{ g}$. Sendo o custo do produto de R\$ 0,0131/g chegamos a $89.131.180 \text{ g} \times \text{R\$ } 0,0131 = \text{R\$ } 1.167.618,00$.

O gasto com antiespumantes foi o único fator que a levedura UAM não superou as cepas tradicionais. Porém, é importante lembrar que nas fermentações industriais muitas leveduras contaminantes acabam trazendo prejuízos ainda maiores quando se estabelecem no processo. A formação de espuma é uma característica muito comum nas leveduras contaminantes como demonstrado por Basso et al. (2008).

5.5.5 Avaliação geral dos resultados técnicos e econômicos

Realizando um balanço dos itens 5.5.1 a 5.5.4 podemos ressaltar que a utilização da levedura UAM contribuiu para:

1- Aumento de produção:

$0,0473$ (ganho de eficiência) $\times$ 742.759.852 litros de etanol = 35.132.540 litros em 5 safras ou 7.026.508 litros / safra

$0,0473$ (ganho de eficiência) $\times$ 44.998.777 sacas de açúcar = 2.128.442 sacas em 5 safras ou 425.688 sacas / safra

2- Geração de valores para 5 safras:

Positivo – R\$ 5.239.650,00 (economia no transporte) – $(1,21 \text{ litros} \times 742.759.852 \times \text{R\$ } 5,83 / \text{m}^3)$

Positivo – R\$ 4.320.000,00 (energia vendida) – $(5 \times 864.000,00 / \text{safra})$

Negativo – R\$ 1.167.618,00 (consumo de produto contra espuma)

Resultado – R\$ 8.392.032,00 em 5 safras ou R\$ 1.678.406,00 / safra

Portanto a utilização da levedura UAM contribuiu para o aumento da eficiência RTC produzindo 702.650 sacas de açúcar e 425.688 litros de etanol por safra. Como o rendimento fermentativo está contabilizado dentro da produção, não podemos quantificar sua participação nos 4,73%, por paralelamente ocorrerem melhorias na extração do caldo da cana e redução de perdas em geral (esgotos, filtros, multijatos e etc.).

No econômico podemos afirmar que apesar do aumento do consumo de produtos para combater a espuma (habilidade inferior da UAM x CAT1) alcançamos uma economia de R\$ 1.678.406,00 / safra.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem obter as seguintes conclusões:

- a) Selecionadas as leveduras D1, D2 e UAM pelo monitoramento, devido a sua dominância e persistência no processo da usina .
- b) As cepas D1 e D2 demonstraram baixas habilidades em laboratório, quando comparadas com a selecionada PE2, sendo não recomendadas. Já a UAM possui excelentes habilidades fermentativas em relação à levedura CAT1.
- c) Aplicada no processo industrial, a levedura UAM demonstrou sua capacidade de dominância por 5 safras, não permitindo a entrada de outra levedura, promovendo melhor controle da fermentação, uma vez que suas características e comportamento são estáveis e conhecidos. Sua utilização permitiu a otimização do uso dos produtos químicos, economia de energia, geração do combustível bagaço e economia do volume de vinhaça a ser aplicado na irrigação.
- d) As etapas apresentadas para se chegar a linhagem UAM, podem servir como guia, para que as usinas busquem sua levedura personalizada, com finalidade de melhorar a lucratividade operacional através da gestão da fermentação.

7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C. J. B.; TARDIN, F. D.; PARRELLA, R. A. da C.; GUIMARÃES, A. de S.; OLIVEIRA, R. M. de.; SILVA, K. M. de J. Sorgo sacarino em diferentes arranjos de plantas e localidades de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.1, p.69-85, 2012.

ALCARDE, A.R. Processamento da cana-de-açúcar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. 2007, Brasília, DF.

ALCARDE, A.R.; MONTEIRO, B.M.S.; BELLUCO, A.E.S. composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *saccharomyces cerevisiae*. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 8, 1612-1618, 2012

ALEXANDRINO, N. Melhoramento de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento**. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba,1996.

AMORIM, H. V. Ethanol Production in Brazil: a Successful History. In: SUGAR PROCESSING RESEARCH INSTITUTE CONFERENCE, 2006, Águas de São Pedro, SP. **Proceedings...** Louisiana: SPRI, 1v, p. 44-47.

AMORIM, H. V. **Quanto custa selecionar uma levedura industrial?**. V Semana de Fermentação Alcoólica “Jayme Rocha de Almeida”. 2011. Disponível em: <<http://stab.org.br/fermentacao/Amorim%20.pdf>>. Acesso em: 12 fev.2015.

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Os principais processos de fermentação para álcool combustível no mundo. Guia Internacional do Álcool, Ribeirão Preto, v. 1, p. 74-77, 2004.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. Simpósio Micro-organismos em Agroenergia: da Prospeção aos Bioprocessos. **Anais...** Embrapa Agroenergia. Brasília, novembro, 2013.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage.** In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Org.). The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. v. 1, p. 39-46.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biothechnol.** 91(5,) 1267-75. (2011).

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

ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. & STUPIELLO, E.N.A. (2011) Bioethanol – What has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? Biofuel production-recent developments and prospects (Bernardes MAS, ed), pp.67-84. **InTech**, ISBN: 978-953-307-478-8..

ANTONANGELO, A.T.B.F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*.** 83p. Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Genética). Botucatu. 2012.

BAI F.W.; ANDERSON W.A.; MOO-YOUNG M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv** 26: 89-105, 2008.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H. V. (1994) Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: In: CONGRESSO NACIONAL

DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. **Anais...** Piracicaba: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 1994. p. 246-250.

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, Aug. 2008.

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

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

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processos de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 6., 1996. Maceió. **Anais...** Maceio: STAB, 1996.p.26-29.

CECCATO-ANTONINI, S.R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**. 2008, v.30, p. 1151-1161. 2008.

CHERUBIN, R. A. (2003) **Efeito da viabilidade** da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Piracicaba, 2003, 124 p. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 2003.

CONAB. **Acompanhamento brasileiro da safra de cana-de-açúcar. Safra 2013/2014**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

CONAB. **Acompanhamento brasileiro da safra de cana-de-açúcar. Safra 2014/2015**. Acomp. da safra bras. de cana-de-açúcar, v. 1 – Safra 2014/15, n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília, dez. 2014.

DE CARVALHO; G.G.; MONTEIRO; R.A.B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 8, p. 47-54, 2011.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 979-991, 2013.

DORTA, C. O. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

FERMENTEC (2008) Fermentec news. Disponível em: <http://www.fermentec.com.br/>. Acesso em: 11 de abr. 2015.

FERMENTEC (2012) Fermentec news. **Fermentação, leveduras selecionadas e cariotipagem: dez perguntas e respostas**. Disponível em: <http://fermentecnews.com.br/2012/10/22/fermentacao/>. Acesso em 11 de abr. 2015.

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

FIGUEIREDO, C.M. **Estudo da influência do gene *FLO8* em fenótipos de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em processos de produção de etanol combustível no Brasil**. 113 p. Tese apresentada ao programa de pós graduação interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan / IPT, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. 2012.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, kent, v. 110, n. 1311, p. 175-181, 2008.

GODOY, A.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; HUGHES, P.; PAULILLO, S.C.L. (2009): A new method to determine yeast viability by phase contrast microscopy. 32nd **European Brewery Conference**, Hamburg, Germany, May 10–14

GNC. **Gestão no Campo. Cana de Açúcar - Alta tecnologia e aspectos sustentáveis**. 2014. Disponível em: <<http://www.gestaonocampo.com.br/biblioteca/alta-tecnologia-easpectos-sustentaveis>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

HAMMOND, J. R. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. *Yeast*, Chichester, England, v. 11, n. 16, p. 1613-27, 1995.

JOSEPH JUNIOR, H. O uso do álcool combustível nos veículos flex-fuel. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). *Álcool combustível – série indústria em perspectiva*. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, 2008. p. 70-81.

KISHIMOTO, M.; SOMA, E. & GOTO, S.H. (1994) Classification of cryophilic wine yeasts based on electrophoretic karyotype, G+C content and DNA similarity. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40:83-93.

KOSARIC, N. Biosurfactants for Soil Bioremediation. **Food Technologi end Biotechnologi**. Zagreb, v.39, n.4, p.295–304, 2001.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. **Biotecnologia**, v. 3. São Paulo: E. Blucher, 2001.

LOPES, M. L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *S. cerevisiae* (linhagem PE- 2) utilizada no processo industrial de produção de etanol**. 2000. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP

LUDWIG, K.M; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v.21, n.1, p. 63-68, 2001.

MABEE, W. E. 2007. Policy options to support biofuel production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 108: 329-357.

MANOCHIO, C. **Produção de bioetanol de cana-de-açúcar, milho e beterraba: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos**. 2014. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas- campus Poços de Caldas, Poços de Caldas, 2014.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, 31:274-282, 2007.

MARTINS, C. A. P. **Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2009.

MENEEGHIN, S.P.; REIS, F.C.; ALMEIDA, P.G.; CECCATO ANTONINI, S.R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from alcoholic fermentation. **Brazilian journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, p. 337-343, 2008.

MIRANDA JÚNIOR, M. **A utilização diferencial de glicose e frutose por leveduras vinícolas em meios contendo fontes de nitrogênio estruturalmente complexas**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

MIRANDA JÚNIOR, M. **“Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras de etanol: efeito da natureza da fonte de nitrogênio”**. 2012. 121f. Trabalho apresentado ao Instituto de Química, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Araraquara, 2012.

MOREIRA C. S.; COSTA, M.A.S.; INSFRAN, T.; CARDOSO, C.A.L.; HERNANDES, J.R.; BATISTOTE, M. Avaliação da Capacidade Fermentativa e Fisiológica de Linhagens de Leveduras Cultivadas em Caldo de Cana. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**. ISSN 2316-5200, número especial v. 2, n. 3, p. 324-327, 2013.

MOREIRA, B.L.D.; PARAZZI, C.; PAPIN L.F.; LOPES J.J.C. Estudo de linhagens de leveduras *saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, Supplement 1, p. 1672-1677, Nov. 2013.

NARENDRANATH, N. V., HYNES, S H.; THOMAS, K.C; INGLEDEW, W. M..Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation.Appliedand **Environmental Microbiology**, v. 63, n.11, p.4158-4163, Nov. 1997.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação

alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fedbatch alcoholic fermentation process. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, n.6, p.697-699, 1994.

OLIVEIRA, M. C. F. L.; PAGNOCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: SINAFERM, 1988. p. 78-81.

OLIVEIRA FILHO, J. H. de. Recepção, preparação, moagem, difusão e clarificação do caldo. Uberaba, 2010. Apostila do Módulo VII. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. FAZU.

OLIVEIRA, A.J.; GALO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; GARCIA, C.E. Curso e treinamento em microbiologia. Piracicaba: Fermentec; FEALQ, ESALQ, 1996. 37p.

OTERO, J. M; PANAGIOTOU, G; OLSSON, L. 2007. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 108: 1-40.

PACHECO, T.F. Tecnologia Industrial. Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – **Tecnologia Qualidade Embrapa**. p. 92-106. 2012.

RAVANELI, G. C. **Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de Mahanarvafimbriolata em cana-de-açúcar**. 2010. Não paginado. Tese (Doutorado em Microbiologia agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

REIS, V.R. (2011) **Caracterização de linhagens selvagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. [dissertação]. Piracicaba: ESALQ, Universidade de São Paulo.

RIBEIRO, E. J. Fermentação Alcoólica. Uberaba, 2010. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. FAZU. 2010.

RIBEIRO, F. A. M. Álcool e açúcar: uma via de mão dupla. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). Álcool combustível – série indústria em perspectiva. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, 2008. p. 48- 57.

SILVA, F. A. L. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada.** 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SILVA, D.F.C. **Análise por técnica de RDA (Representational Difference Analysis) da expressão gênica diferencial, para a identificação de fatores genéticos associados à produção de etanol em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*.** 2012. 98f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre, Araraquara, 2012.

SILVA-FILHO, E.A.; DE MELO, H.F.; ANTUNES, D.F.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M., SIMÕES, D.A. & MORAIS JR. M.A. (2005) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **J Ind Microb. Biot.** 32:481–86.

SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R.; SIVAKUMAR, T. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 13, p. 1386-1393, 2014.

SOARES, T.L.; SILVA, C.F. e SCHWAN, R.F. Acompanhamento do processo de fermentação para produção de cachaça através de métodos microbiológicos e físico-químicos com diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.31, n. 1, p.184-187, 2011.

SOUZA, C. C.; THOMAZ, D.; CIDES, E. R.; OLIVEIRA, K. F.; TOGNOLLI, J.; LALUCE, C. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1667-1677, 2007.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** 2001. 86 p. Tese Doutorado Universidade estadual de Campinas. 2001.

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v. 17, p.43-46, 1981.

SUHAIMI, S.N.; PHANG, L.Y.; MAEDA, T.; ABD-AZIZ, S.; WAKISAKA, M.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M.A. Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* SS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.2, p.506-516, 2012.

TAVARES, F.C.A. Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes. **STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v.10, n.5, p.45-49, 1992.

TIBAYRENC, P.; BELLOY, L.P.; GHOMMIDH, C. J. **Ind. Microbiol. Biotechnol.** 2011, 38, 687.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

VENTURA, M.; ZINK, R. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2002. vol. 68 no. 12.

VENTURINI FILHO, W.G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F.V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcóolica. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 31, n. 2, p. 227-236, 2013.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. 1. ed. USA: Wiley, 1998.

ZAGO, E.A.; SILVA, F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool. Piracicaba: Fermentec; FEALQ, ESALQ, 1996. 194p.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

São José do Rio Preto, 22/05/2015.

Fernando Antônio da Costa Figueiredo Vicente